

Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(*Dr. rer. nat.*)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

**„Betrachtung von Einflüssen auf die initialen
Zelladhäsionskräfte mittels Einzelzellkraftspektroskopie“**

vorgelegt von:

Philipp Alexander Wysotzki, geb. am 09.01.1986 in Hamburg

Rostock, 26.07.2019

Wissenschaftliche Betreuung:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Jan Gimsa, Universität Rostock

Dr. rer. nat. Werner Baumann, Universität Rostock

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002585

Gutachter:1. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Jan Gimsa
Universität Rostock
Lehrstuhl für Biophysik

2. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Patrick Elter
Technische Hochschule Mittelhessen
Institut für Biomedizinische Technik

Eingereicht am: 26.07.2019

Verteidigt am: 25.10.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	IV
Abstract.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Biologisch-medizinischer Hintergrund	1
1.2. Zelladhäsion.....	2
1.2.1. Prokaryoten	2
1.2.2. Eukaryoten.....	6
2. Stand der Technik und Forschung.....	9
2.1. Methoden zur Untersuchung der Zelladhäsion.....	9
2.1.1. Einteilung der Methoden	9
2.1.2. Detektion der Bindungsereignisse.....	10
2.1.3. Detektion der Lösung von Zell-Oberflächen Bindungen	11
2.1.4. Methodenübersicht.....	17
2.2. Zell-Substratwechselwirkung	19
2.2.1. <i>In-vitro</i> -Substratbeschichtungen	19
2.2.2. <i>In-vivo</i> -Substratbeschichtungen	21
3. Material und Methoden	23
3.1. Material	23
3.1.1. Geräte.....	23
3.1.2. Verbrauchsmaterial	23
3.1.3. Chemikalien und Zellkulturmedien	24
3.1.4. Zelllinien und Bakterienstamm.....	24
3.2. Beeinflussung der Adhäsion von gleichgeladenen Oberflächen durch Spermidin in Abhängigkeit vom pH-Wert.....	25
3.3. Einfluss von beschichtetem und unbeschichtetem Siliziumnitrid auf die Initialadhäsion von Eukaryoten und Prokaryoten	25
3.3.1. Zellkultur.....	25
3.3.2. Beschichtung des Glassubstrats mit Siliziumnitrid	26

3.3.3.	Beschichtung der Siliziumnitridoberflächen mit Zellkultur- beschichtungssubstanzen	28
3.3.4.	Cantilever-Beschichtung	28
3.3.5.	Vorbereiten der Zellen für die SCFS-Messung	29
3.3.6.	Immobilisieren der Zellen am Cantilever	29
3.3.7.	Messablauf	29
3.3.8.	Bestimmung der Laminin-Konzentration auf Polyethyleneimine (PEI) und Poly-D- Lysin (PDL)	30
3.4.	Vergleich von Initial- und Langzeitadhäsion	30
3.4.1.	Zellkultur	30
3.4.2.	Kollagenbeschichtung	30
3.4.3.	Fibronektinbeschichtung	31
3.4.4.	Einzelzellkraftspektroskopie auf Fibronektin und Kollagen	31
3.4.5.	Fluoreszenzmikroskopie	32
3.4.6.	Kontaktwinkelmessung an Glas, Kollagen Typ I und Fibronektin ¹⁰	32
3.5.	Einfluss des pH-Wertes auf die Initialadhäsion	32
3.5.1.	Zellkultur	32
3.5.2.	Beschichtung des Glassubstrats mit Titan	33
3.5.3.	Beschichtung der Titanoberflächen mit Kollagen Typ I	33
3.5.4.	SCFS auf Kollagen und Titan	33
3.5.5.	Zeta-Potential-Messungen an Zellen und Oberflächen	34
3.5.6.	Herstellung des Implantat-Modellsystems	35
3.5.7.	Einfluss des Implantat-Modellsystems auf <i>Staphylococcus capitis sub. capitis</i> (Scc)	36
4.	Ergebnisse und Diskussion	37
4.1.	Beeinflussung der Adhäsion von gleichgeladenen Oberflächen in Abhängigkeit vom pH- Wert durch Spermidin	37
4.2.	Einfluss von PEI, PEI-Laminin und PDL-Laminin Oberflächen-beschichtungen auf die Initialadhäsion von Zellen auf Siliziumnitrit	43
4.2.1.	Normierung der Ergebnisse	46
4.2.2.	Normierung auf Siliziumnitrid je gemessene Kontaktzeit	47
4.2.3.	Normierung auf Siliziumnitrid bei 5 s-Kontaktzeit	48
4.2.4.	Einfluss von Laminin auf PEI- und PDL-beschichteten Oberflächen auf die initiale Zelladhäsion	52
4.2.5.	Einfluss der verschiedenen Zelltypen auf die initialen Adhäsionskräfte	54
4.2.6.	Zusammenfassung	56
4.3.	Vergleich der Initial- mit der Langzeitadhäsion mit SCFS und FluidFM	57
4.3.1.	SCFS	58

4.3.2.	FluidFM®	60
4.3.3.	Fluoreszenzaufnahmen des Aktin-Zytoskeletts von L929- und MC3T3-Zellen auf Glas, Fibronketin und Kollagen Typ I	62
4.3.4.	Kontaktwinkelmessung an Glas, Kollagen Typ I und Fibronektin.....	64
4.3.5.	Zusammenfassung.....	64
4.4.	Beeinflussung der Zelladhäsion von Prokaryoten und Eukaryoten durch den pH-Wert	65
4.4.1.	SCFS-Messungen an MC3T3-Zellen	65
4.4.2.	SCFS-Messungen an <i>Staphylococcus capitis sub. capitis</i> (Scc)	69
4.4.3.	Zeta-Potential-Messung an Titan und kollagenbeschichtetem Titan sowie MC3T3-Zellen und Scc-Zellen	70
4.4.4.	SCFS-Zellverhalten und Zeta-Potential	71
4.4.5.	Aufbau eines Implantat-Modellsystem zur Optimierung des Anwachsverhaltens von Zellen auf Implantatoberflächen	73
4.4.6.	Einfluss der alkalisierenden Wirkung des Implantat Modells auf eukaryotische Zellen	74
4.4.7.	Einfluss der alkalisierenden Wirkung des Implantat Modells auf prokaryotische Zellen	76
5.	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick.....	78
Referenzen		80
Anhang		91
Danksagung		111

Zusammenfassung

Diese Arbeit diskutiert den Einfluss des pH-Wertes und polymerer Oberflächenbeschichtungen auf die Adhäsion von Zellen. Die Ablösekkräfte verschiedener eukaryotischer sowie prokaryotischer Zellen von verschiedenen Oberflächen wurden mit der traditionellen Einzelzell-Kraftspektroskopie (SCFS) untersucht. Die durchgeführten Experimente zeigen, dass unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Oberflächen und den negativ geladenen Zellen den entscheidenden Faktor in der ersten Phase der initialen Zelladhäsion bilden. Dabei schirmte eine zusätzliche Lamininschicht die positiven Ladungen von Oberflächenbeschichtungen mit Polyethylenimin (PEI) oder Poly-D-Lysin (PDL) ab. Jedoch können lange flexible Schleifen des PEI-Polymers durch die oberflächengebundene Lamininschicht ragen und leicht an eukaryotische Zelloberflächen oder kleine prokaryotische Zellen binden. Durch die Kombination von SCFS mit der FluidFM®-Technik, die das Ablösen auch von reifen, stark adhären Zellen ermöglicht, konnten die maximalen Ablösekkräfte (MDFs) in der ersten Phase der Anfangsadhäsion mit denen der letzten Phase der reifen Zelladhäsion verglichen werden und zwar sowohl auf unbeschichteten als auch auf zelltypspezifisch beschichteten Glasoberflächen. Für L929-Zellen konnte gezeigt werden, dass ihre MDFs in der ersten Phase der Anfangsadhäsion von unbeschichteten Oberflächen jeweils höher als von zelltypspezifischen beschichteten Oberflächen waren, während sich dieses Verhältnis in der reifen Zelladhäsionsphase umkehrte. Im Hinblick auf medizinische Implantatoberflächen wurde mit SCFS der Einfluss eines alkalischen pH-Wertes auf die erste Phase der Anfangsadhäsion von MC3T3-Zellen an Titanoberflächen untersucht. Beim Vergleich der MDFs bei pH 7,4 und 8,0 wurden bei unbeschichtetem Titan nur geringe Unterschiede beobachtet, während die MDFs auf kollagenbeschichteten Oberflächen bei pH 8,0 deutlich höher waren.

Abstract

This thesis discusses different strategies to actively influence the adhesion of cells through pH changes and polymeric surface coatings. Detachment forces of different eukaryotic as well as prokaryotic cells on different surfaces were investigated by the traditional single cell force spectroscopy (SCFS). The experiments conducted indicate that non-specific electrostatic interactions between surfaces and negatively charged cells are the decisive factor in the first phase of their initial adhesion. An additional laminin layer screens the positive charges of polyethyleneimine (PEI) or poly-D-lysine (PDL) surface coatings. However, PEI's long flexible loops protruding from the surface-bound layer can span the laminin layer and easily bind to eukaryotic cell surfaces or small prokaryotic cells. For L929 fibroblasts and MC3T3 osteoblasts, the first phase of initial adhesion could be compared with the last phase of mature cell adhesion to untreated and cell type-specific coated glass surfaces by combining SCFS with the FluidFM® technique, which enables the detachment of mature, strongly adherent cells. L929 cells showed higher maximum detachment forces (MDFs) from uncoated surfaces in SCFS, while the FluidFM® experiments showed higher MDFs from cell type-specific coated surfaces. From the point of view of medical implant surfaces, the influence of the alkaline pH value on the initial adhesion of MC3T3 to titanium surfaces was investigated with SCFS. When comparing the MDFs at pH 7.4 and 8.0, only minor differences were observed for uncoated titanium, while the MDFs on collagen-coated surfaces were clearly higher at pH 8.0 in the first phase of initial adhesion.

Abkürzungsverzeichnis

AFM	atomic force microscope
BMPs	bone morphogenic proteins
CAD	AutoCAD Mechanical 2010 ®
CAM	Bungard RoutePro
CFU	colony forming units
CHO	Chinese Hamster Ovaria
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DBS	Tiefenhirnstimulations
DC	direct current
DIV	Tage <i>in-vitro</i>
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek-Theorie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
ECM	extrazellulären Matrix
EPS	extrazellulärer polymerer Substanzen
GUVs	giant unilamellar vesicles
k_b	Bolzmankonstante
KOH	Kaliumhydroxid
L929	Fibroblasten-Zelllinie
MC3T3(-E1)	Osteoblasten ähnliche Zelllinie
MDF	Maximum Detachment Force
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
NMR	nuclear magnetic resonance
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDL	Poly-D-Lysin
PEI	Polyethylimin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PET	Polyethylen
pK_a	Säurekonstante

PLL	Poly-L-Lysin
PMMA	Polymethylmethacrylat
PNZ	murine primäre neuronale Mauszellen
PVA	Polyvinylalkohol
PVD	physical vapour deposition
QCM	Quarzkristall-Mikrowaage
QCM-D	Quarzkristallmikrowaage mit Dissipationmessung
RF	radio frequency
RGD	Bindungsstellen Bindungsstelle (Einbuchstabencode - R: Arginin, G: Glycin und D: Asparaginsäure)
Scc	<i>Staphylococcus capitis sub. capitis</i>
SCFS	single cell force spectroscopie
Si ₃ N ₄	Siliziumnitrid
T	Temperatur in Kelvin
TFM	traction force microscopy
α-MEM	α-Modified Eagles Medium
μPIV	micro particle image velocimeter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schritte der Adhäsion von prokaryotischen Zellen auf einer Oberfläche.	2
Abbildung 2: Qualitativer Verlauf der freien Energie ausgehend vom Abstand von einer Oberfläche.	3
Abbildung 4: Phasen der Zelladhäsion eukaryotischer Zellen auf einer extrazellulären Matrix (ECM)	6
Abbildung 5: Schematische Darstellung von aktivierten Integrinen und Bildung von ECM-Integrin Zytoskelettbindungen an der fokalen Adhäsionsstelle unter Anwendung einer externen Zugbelastung.....	7
Abbildung 7: Kategorien, in die die verschiedenen Methoden zur Untersuchung von Zelladhäsion unterteilt werden können.	9
Abbildung 8: Schematische Schnittzeichnung eines AFMs für biologische Fragestellungen.	13
Abbildung 9: Schematische Darstellung eines SCFS-Messzyklus einer eukaryotischen Zelle (links) und die daraus resultierende Kraft-Abstands-Kurve (rechts).....	16
Abbildung 10: Schematischer Aufbau der FluidFM-AFM-Erweiterung. Gezeigt wird der mikrofluidische Cantilver mit Haltevorrichtung.	17
Abbildung 11: Unterteilung der Integrin-Untereinheiten die spezifisch Bindung an Kollagen, RGD enthaltenen Proteinen und an Leukozyten Rezeptoren induzieren..	20
Abbildung 12: Vier Glasdeckgläser (a) werden vor der Beschichtung in die Schattenmaske (b) eingelegt.....	26
Abbildung 13: Schematischer Ablauf der Beschichtung der Siliziumnitridoberflächen.	28
Abbildung 14: Glasdeckgläser mit vier PVD-beschichteten Titanoberflächen.....	33
Abbildung 15: Spritzensystem zum Ändern des pH-Werts in der Petrischale.....	34
Abbildung 16: Kugel-und-Stab-Darstellung eines diprotonierten Spermidinmoleküls mit Kohlenstoff- (schwarz), Wasserstoff- (weiß) und Stickstoff- (blau) Atomen..	37
Abbildung 17: Abhängigkeit der MDF von pH-Wert (A) und Spermidinkonzentration (B).....	38
Abbildung 18: Spermidin-induzierte MDF in Abhängigkeit vom pH-Wert.	40
Abbildung 19: Sigmoidale Anpassung der MDFs aller Spermidinkonzentrationen.	40
Abbildung 20: Berechnete Kraftkoeffizienten von f_2 und f_3 der diprotonierten (offene Kreise) und triprotonierten (gefüllte Kreise) Spermidinarten bei unterschiedlichen Spermidinkonzentrationen (siehe Gleichung 4.1.8).....	41
Abbildung 21: Repräsentative mikroskopische Bilder der drei Zelltypen PNZs (A), MC3T3 (B) und Scc-Zellen, die am Cantilever befestigt sind, vor (links) und nach (rechts) einem kompletten Messzyklus.....	43
Abbildung 22: Mittlere Mess-MDFs (F_n, s, t) der drei Zelltypen, PNZ (schwarz, $n=12$), MC3T3 (hellgrau, $n=14$) und Scc (dunkelgrau, $n=10$) auf der Siliziumnitrid-Referenzfläche für Kontaktzeiten von 1, 2 und 5 s (a)	44
Abbildung 23: Fluoreszenzbilder der (a) PEI/Laminin und (b) PDL/Laminin Oberflächen, die mit fluoreszenzmarkierten Laminin-Antikörpern immungefärbt wurden..	45
Abbildung 24: Spezifische MDFs (F_s, t_{spec}) von PNZ (schwarz), MC3T3 (hellgrau) und Scc (dunkelgrau) auf PEI-, PEI/Laminin- und PDL/Laminin-Oberflächen.....	48
Abbildung 25: Mittlere relative MDFs (Φ_n, s, t_{5sec}) von PNZ (schwarz), MC3T3-Zellen (hellgrau) und Scc-Zellen (dunkelgrau) auf (a) Siliziumnitrid-, (b) PEI-, (c) PEI/Laminin- und (d) PDL/Laminin- Oberflächen.	49
Abbildung 26: Mittlere spezifische MDF (F_s, t_{spec}) (Gleichung 4.2.2.4) von PNZ (schwarz), MC3T3 (hellgrau) und Scc (dunkelgrau) auf (a) Siliziumnitrid-, (b) PEI-, (c) PEI/Laminin- und (d) PDL/Laminin- Oberflächen.	50
Abbildung 27: Schematische Darstellung einer negativ geladenen Zelloberfläche in Kontakt mit einer PEI/Laminin-beschichteten Siliziumnitridoberfläche.....	54

Abbildung 28: Maximale Ablösungskräfte (MDFs) von L929 auf Glas- und Fibronektinoberflächen in der ersten Phase des initialen Adhäsionsprozesses.	58
Abbildung 29: MDFs von MC3T3-Zellen auf Kollagenfilmen und unbeschichteten Gläsern in der ersten Phase der Anfangsadhäsion..	59
Abbildung 30: Hellfeldaufnahmen von FFS-Cantilevern über L929-Zellen auf Glas (a) und Fibronektinbeschichtung (b) einen Tag nach der Zellaussaat (DIV 1).	60
Abbildung 31: MDFs von L929-Zellen auf Glas und Fibronektinbeschichtung nach vollständiger Spreitung und Reifung der fokalen Kontaktpunkte.	61
Abbildung 32: Hellfeldbilder von FFS-Cantilevern über MC3T3-Zellen auf Glas (a) und auf Kollagenbeschichtung (b) einen Tag nach der Zellaussaat.	61
Abbildung 33: MDF von MC3T3-Zellen auf Kollagenfilmen im stabilen Adhäsionszustand, nach vollständiger Spreizung und vollständiger Reifung der fokalen Adhäsionen.	62
Abbildung 34: Fluoreszenzbilder von L929- (oben) und MC3T3-Zellen (unten) L929-Zellen (DIV3) die auf Glas (links) und Fibronektin (rechtsoben) sowie die MC3T3 (DIV2) auf Kollagen Typ I (linksunten) kultiviert wurden.	63
Abbildung 35: Beispiel zweier Kraftabstandskurven von derselben Zelle auf Kollagen-beschichtetem Titan bei pH 7,4 (grün) und 8,0 (blau).	65
Abbildung 36: Mittlere relative MDFs auf purem und Kollagen-beschichtetem Titan.	66
Abbildung 37: Beispielhafte Kraftabstandskurve einer MC3T3-Zelle bei pH 7,4 auf Kollagen zur Verdeutlichung der Bindungsbrüche zwischen Oberfläche und Zelle.	66
Abbildung 38: Anzahl der Abrissereignisse in den Kraft-Abstands-Kurven auf unbeschichtetem und Kollagen-beschichtetem Titan (n=8;p<0,5).	67
Abbildung 39: Durchschnittliche Distanz zwischen Oberfläche und Zelle, bei der die Zelle vollständig von der Oberfläche getrennt war.	68
Abbildung 40: Durchschnittlicher Kraftabfall eines Abrissereignisses von MC3T3-Zellen bei pH 7,4 und pH 8,0 auf unbeschichtetem und Kollagen beschichtetem-Titan.	69
Abbildung 41: Relative maximale Abrisskraft von <i>Stph. capitis sub. capitis</i> bei pH 7,4 und pH 8,0 auf unbeschichtetem und Kollagen-beschichtetem Titan (n=10).	70
Abbildung 42: pH-abhängiges Zeta-Potential von unbeschichtetem (schwarze Quadrate) und Kollagen-beschichtetem (schwarze Kreise) Titan.	70
Abbildung 43: Zeta-Potential von MC3T3 und Bakterien Zellen bei pH 7,4 und 8,0 (n>20 pro Kondition).	71
Abbildung 44: Schematischer Aufbau des Implantat-Modellsystems.	73
Abbildung 45: pH-Wert im Medium über der alkalisierenden Matrix (1 M NaOH).	74
Abbildung 46: Konfokalmikroskopische Aufnahmen eines Loches in der Titanoberfläche des Implantatmodellsystems.	75
Abbildung 47: Fluoreszenz-Aufnahmen des „Dead/Live-Assays“ auf perforierten Titanoberflächen.	77

1. Einleitung

1.1. Biologisch-medizinischer Hintergrund

Die Zelle ist die kleinste lebende Einheit. Schließen sich große Mengen von Zellen in einem multizellulären Organismus zusammen, so bilden sie einzelne funktionelle Einheiten. In diesem Zustand sind die einzelnen Zellen überwiegend nicht mehr in der Lage, allein zu überleben. Dabei sind sie nicht nur auf die Versorgung mit Nährstoffen durch andere Zellen oder andere Gewebe angewiesen, sondern auch auf den Kontakt untereinander. Dieser Zell-Zell-Kontakt beeinflusst auf mikroskopischer Ebene die Proliferation der einzelnen Zelle und dadurch auf makroskopischer Ebene die Form und Eigenschaft von Geweben, die wiederum die Form und Eigenschaften von Organen beeinflussen. Damit ist der Zell-Zell-Kontakt ein integraler Bestandteil für das Überleben von multizellulären Organismen. Kommt es zu einer Verletzung oder anderen Ereignissen, bei der der Zell-Zell-Kontakt gelöst wird, versucht der Organismus diese wieder herzustellen. Zerstörte Zellen werden durch das Immunsystem absorbiert und neue Zell-Zell-Kontakte werden gebildet. Neu gebildete Zellen füllen aber auch Lücken. Dieser Heilungsvorgang ist jedoch oft nur in einem beschränkten Maße möglich, daher versucht die Medizin, den menschlichen Körper durch Implantate bei der Heilung zu unterstützen. Hierbei spielt die Wechselwirkung zwischen artifizieller Implantatoberfläche und den umgebenden Zellen eine integrale Rolle [1]. Die angestrebten Eigenschaften der Wechselwirkung variieren stark, z.B. soll der Schaft eines künstlichen Hüftgelenks eine starke Osseointegration fördern [2]. Dagegen ist eine starke Zelladhäsion von fibrösem Gewebe auf den Signalübertragungselektroden bei einem Cochlea-Implantat ungewollt, da dieses die Signalübertragung negativ beeinflusst [3].

Bei orthopädischen Endoprothesen ist neben der aseptischen Lockerung, die periprostetische Infektion der Hauptgrund für das Versagen. Dabei adhären Bakterien auf der Implantatoberfläche und bilden dort einen Biofilm aus [4]. Die Zahl der Infektionen liegt bei 1,5 – 2,5 % bei Erstimplantationen von Hüft- und Kniegelenks-Endoprothesen und 3,2 – 5,6 % bei Revisionsoperationen [4]. Bei 390.000 Knie- und Hüftgelenks-Implantationen ergibt das eine Zahl von 5850 periprostetischen Infektionen. Daher sollten Implantatoberflächen so gestaltet sein, dass neben der Beeinflussung von körpereigenen Zellen die Gefahr von Infektionen reduziert wird [2]. Ziel dieser Arbeit ist es, ein besseres Verständnis der Zelladhäsion von Prokaryoten und Eukaryoten durch den Einsatz von Einzelzell-Kraftspektroskopie (SCFS – engl. „single cell force spectroscopy“) zu erlangen. Diese Methode erlaubt es, die Kraft zwischen Zellen und Oberflächen zu quantifizieren. SCFS ist bisher aufwändig und keine Standardmethode für die Suche nach neuen

Implantatoberflächen. Ein Nachteil von Einzelzellmessung ist die hohe Streuung der Messergebnisse, weil sich die Eigenschaften einer einzelnen Zelle stark von den durchschnittlichen Eigenschaften der Zellpopulation unterscheiden können. Hier wurde dieses Problem dadurch verringert, indem verschiedene Oberflächen mit derselben einzelnen Zelle untersucht werden, was wiederum die Bildung von relativen Werten erlaubte. Aus denartigen Experimenten gewonnenen Erkenntnisse sind von Bedeutung für die Entwicklung neuer Implantatoberflächen.

1.2. Zelladhäsion

1.2.1. Prokaryoten

Der Ausgangspunkt für prokaryotische Zelladhäsion sind Zellen, die sich frei in einem Medium bewegen und vereinfacht als negativ geladene Kolloidpartikel angenommen werden können. Die Zelladhäsion von Prokaryoten und die darauffolgende Biofilmbildung werden im Allgemeinen in vier verschiedene Phasen unterteilt [5]. Während der ersten Phase wird das Bakterium zur Oberfläche transportiert. Die treibende Kraft ist hierbei Konvektionsdiffusion oder Sedimentation, durch die die Zellen zur Oberfläche transportiert werden. Es sollte hier angemerkt werden, dass Bakterien sich auch aktiv, zum Beispiel durch Flagellen bewegen können und dadurch ein aktiver zur Oberfläche hin bewegen kann.

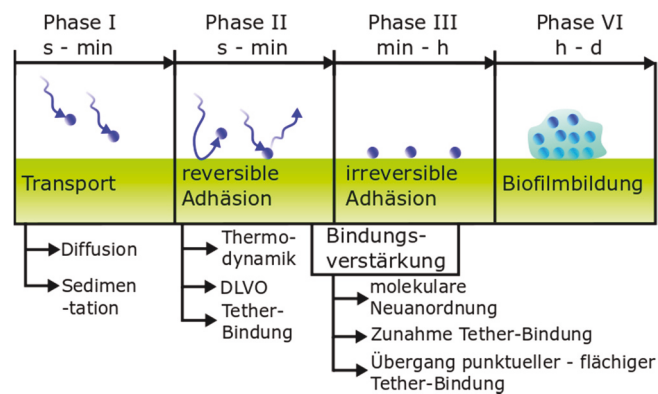


Abbildung 1: Schritte der Adhäsion von prokaryotischen Zellen auf einer Oberfläche. Erweitert und übersetzt von Carniello et al. [5].

Die zweite Phase besteht in der reversiblen Adhäsion der Zellen an die Oberfläche. Dieser Teil der Adhäsion ist ein hauptsächlich thermodynamisch getriebener Prozess. Daher kann dieses durch die DLVO-Theorie (benannt nach Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) beschrieben werden [6]. Die bakterielle Adhäsion an Oberflächen wird hierbei als Ergebnis von Van der Waals-Kräften und elektrostatischen Doppelschicht-Wechselwirkungen sowie als erweiterte Säure-Basen-Bindung dargestellt [7]. Das Ergebnis zeigt die Abhängigkeit der freien Enthalpie (ΔG_{ad}) vom Abstand zwischen der Bakterien- und der Substratoberfläche (Abbildung 2).

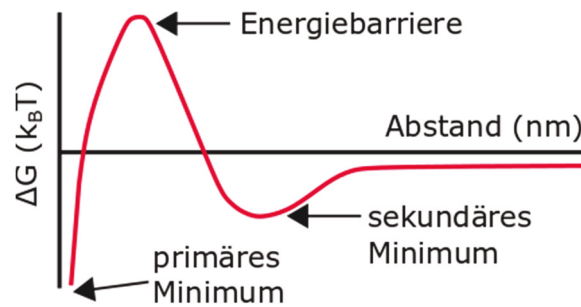


Abbildung 2: Qualitativer Verlauf der freien Energie ausgehend vom Abstand von einer Oberfläche. Entnommen aus Carniello et al. [5].

Hierbei ergeben sich zwei Minima, ein primäres und ein sekundäres Minimum [8]. Durch die oben beschriebenen Transportmechanismen lokalisiert sich das Bakterium im energetisch günstigen sekundären Minimum, da der Übergang in das primäre Minimum durch eine Energiebarriere versperrt ist. Dieser Zustand ist aber unter physiologischen Bedingungen nur um wenige $k_B T$ (k_B : Boltzmannkonstante, T : Temperatur in Kelvin) günstiger als der Zustand im freien Bulk-Medium und die reversibel adhären Bakterien lösen sich spontan wieder von der Oberfläche [8].

Die dritte Phase bildet den Übergang von der reversiblen in die irreversible Adhäsion. Bei diesem Übergang muss die Energiebarriere zwischen den beiden Minima überwunden werden. Dies kann auf zwei verschiedene Arten geschehen. Die Bakterien lokalisieren frei im sekundären Minimum und mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit überwinden sie die Barriere. Dies ist ein rein thermodynamisch getriebener und stochastischer Prozess und das Bakterium kann als ein inertes Kolloidpartikel betrachtet [5]. Die Wahrscheinlichkeit für den Übergang von der reversiblen zur irreversiblen Adhäsion wird daher mittels Boltzmann-Statistik beschrieben und ergibt sich aus der Tiefe des sekundären Minimums, der Gleichgewichtsposition zwischen Bakterium und Oberfläche sowie der freien Enthalpie der Adhäsion [9]. Einen anderen Mechanismus für die Überwindung der Barriere zwischen sekundärem und primärem Minimum stellt die „Tether“¹ vermittelte Adhäsion dar [10]. Bakterien besitzen teilweise Zelloberflächenanhänge wie Fibrillen oder Fimbrien. Diese aus der Zelloberfläche herausragenden Strukturen können die Energiebarriere einfacher durchdringen als die im Vergleich große Zelle. Deshalb kann die Zelle sich nun im sekundären Minimum aufhalten und dennoch über diese Tether an die Oberfläche gebunden sein [11]. Dies verhindert zu einem gewissen Teil das Sich-Entfernen der Zelle von der Oberfläche zurück ins Bulk-Medium und verringert den Abstand zur Oberfläche. Ein einzelner Tether ist nicht in der Lage, das Bakterium irreversibel an die Oberfläche zu binden, erhöht aber die Aufenthaltszeit und damit die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von weiteren Oberflächen-

¹ dt. Haltegurt bzw. Haltestrick

Anknüpfungspunkten, die zu einer stärkeren Anbindung führen [11,12]. Hierbei sollte angemerkt werden, dass die Bildung von diesen Anknüpfungspunkten ein dynamischer Prozess ist und Tether-Bindungen reversibel sind [13]. Dennoch kann durch die Ausbildung einer Vielzahl von Tethern eine starke Anbindung an die Oberfläche erfolgen, da die Wahrscheinlichkeit der gleichzeitigen Ablösung aller Anknüpfungspunkte mit höherer Anzahl abnimmt, was zu einer fast irreversiblen Adhäsion führt [14]. Die Kontaktfläche zwischen den Bakterien und der Oberfläche vergrößert sich aber nicht durch eine höhere Anzahl Tethern. Dies geschieht erst, wenn die punktuellen Bindungen der Fibrillen- oder Fimbrienenden an die Substratoberfläche in eine flächige Bindung übergehen. Dazu legen sich die faserähnlichen Strukturen flächig auf die Oberfläche und verkürzen den Abstand zwischen Substrat und Bakterienzellwand [15]. Dieser Übergang von einer punktuellen zu einer flächigen Bindung wurde durch die zeitliche Dissipationsänderung von anhaftenden Bakterien an QCM-D-Kristalloberflächen (Quarzkristallmikrowaage-Dissipation) nachgewiesen [15]. Hierbei zeigten Streptokokken eine Abnahme der Dissipationsverschiebung über die Zeit, was auf diesen Übergang von punktueller, Tether-vermittelter zur flächigen Adhäsion hinweist [15]. Dieser Effekt trat hingegen nicht bei den Kontrollversuchen mit inerten kolloidalen Partikeln auf [15].

Sowohl die Tether-vermittelte als auch die nicht-Tether-vermittelte Adhäsion führen wahrscheinlich dazu, das Grenzflächenwasser aufgrund der geringen Molekülgröße und der niedrigen Viskosität des H₂O-Moleküls innerhalb von Sekunden nach dem ersten Kontakt eines Bakteriums mit einer Substratoberfläche sukzessiv zu verdrängen [15]. Die Entfernung von Grenzflächenwasser ermöglicht eine größere Annäherung und die Bildung attraktiver Wechselwirkungen mittels Säure-Basen-Bindung [15]. Hierfür spricht auch, dass viele Bakterien mit hydrophoben Oberflächenstrukturen ausgestattet sind, die die Verdrängung von Grenzflächenwasser begünstigen [16].

Der vierte und letzte Schritt ist die eigentliche Biofilmbildung (Abbildung 1). Sie beschreibt den Übergang von einer einzelnen Bakterienzelle zu einer Kolonie von vielen Tausenden bis Millionen Bakterien, die in einem Verbund leben. Die bakterielle Zellwand verformt sich durch die Adhäsionskräfte, bis diese durch die Gegenkräfte kompensiert werden, die sich aus der das Zytoplasma umgebenden starren Peptidoglykanschicht und dem intrazellulären Druck des Zytoplasmas selbst ergeben. Dies verstärkt die molekulare Interaktion mit Substratmolekülen, da die Verformung mehr Moleküle, einschließlich der Moleküle im Zytoplasma, näher an die Substratoberfläche bringt und erhöht die weitreichenden Van der Waals-Anziehungskräfte [17]. Aus dem Grund kann die Verformung der Zellwand als ein weiterer physikalisch-chemischer

Mechanismus zur Stärkung der Bindung betrachtet werden. Die Zellwandverformung erhöht nicht nur die Adhäsionsstärke, sondern löst auch die zelleigene Adhäsionskraftsensorik aus [18]. Diese in der Membran positionierten Sensormoleküle reagieren auf die Deformation der Zellwand und zeigen dabei das Vorhandensein einer Substratoberfläche sowie die Stärke des Adhäsionszustands aufgrund der Veränderungen der Oberflächenspannung der Lipidmembran an [18]. Hierdurch werden die phänotypischen und genotypischen Eigenschaften des gesamten Biofilms durch die Sekretion von bestimmten Molekülen für die Kommunikation mit anderen Bakterien aktiv beeinflusst [18]. Diese extrazelluläre Kommunikation ist nötig, da anhaftende Bakterien eine viel größere Substratfläche als ihre geometrische Fläche im planktonischen Zustand einnehmen und ihre Anzahl deshalb an der Substratoberfläche am Anfang der Biofilmbildung relativ gering ist. Die bakterielle Reaktion auf die direkte Adhäsionskraftmessung kann durch *Quorum Sensing* übertragen werden, ein Kommunikationssystem, das auf der Produktion und Erfassung von molekularen Autoinduktoren basiert [19]. Die Entfernung, über die Bakterien durch Quorum Sensing kommunizieren können, kann je nach Diffusionsfähigkeit des Autoinduktors, Adsorption an Matrixkomponenten und der für die Erlangung einer Antwort erforderlichen Schwellenkonzentration des Autoinduktors stark variieren. Sie liegt zwischen 5 und 200 μm [20,21]. Da Biofilme unter natürlichen Bedingungen Dicken von mehr als 300 μm erreichen können [22,23], kann die Adhäsionskraftmessung in der Regel nur auf eine begrenzte Anzahl oberflächennaher Bakterien-schichten übertragen werden. Bakterien, die auf molekulare Autoinduktoren ansprechen, zeigen Eigenschaften, die denen der anfänglich anhaftenden Bakterien, welche in direktem Kontakt mit einer Substratoberfläche stehen, ähneln [24].

Während die anfängliche Bindungsverfestigung ein rein physikalisch-chemischer Prozess ist, der sowohl in Bakterien als auch in abiotischen kolloidalen Partikeln stattfindet, ist die Produktion extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS) bei bakterieller Adhäsion an Oberflächen ein biologischer Prozess, der zur Stärkung der Bakterien-Substrat-Bindung und der Resistenz gegen äußere Einflüsse beiträgt. Die hauptsächlichen Bestandteile der EPS sind ein Gemisch aus verschiedenen Polysacchariden wie z. B. Alginat, Cellulose, Dextran und Levan, sowie verschiedensten Proteinen, Lipiden, Phospholipiden, Glycoproteinen, Glycolipiden, Lipopolysacchariden [25]. Hinzu kommt oft auch extrazelluläre DNA [26]. Die Zusammensetzung der EPS kann sehr unterschiedlich sein und ist abhängig von den am Biofilm beteiligten Bakterien-spezies.

1.2.2. Eukaryoten

Da die Zelladhäsion eukaryotischer Zellen ein umfangreiches Thema darstellt und die experimentellen Arbeiten ausschließlich mit Säugetierzellen und Zelllinien, die aus Säugetierzellen entstanden, durchgeführt wurden, wird sich der folgende Abschnitt auf diese Arten von Zellen beschränken.

Im Gegensatz zu Prokaryoten, die auch planktonisch leben können, ist die Zelladhäsion für Eukaryoten ein integraler Bestandteil der Zellkommunikation und –regulation und deshalb von grundlegender Bedeutung für die Entwicklung und Erhaltung von Zellverbänden und Geweben. Hierbei sollte darauf hingewiesen werden, dass es auch Ausnahmen gibt, bei denen Zelladhäsion im regulären Fall unterbunden werden muss, wie z.B. bei Erythrozyten [27]. Die Zelladhäsion ist die Fähigkeit einer einzelnen Zelle, an einer anderen Zelle, einer extrazellulären Matrix (ECM) oder einem künstlichen Substrat zu haften. Aus diesem Grund ist wichtig zu verstehen, wie Zellen interagieren und ihr Verhalten in multizellulären Organismen koordinieren. *In-vitro* sind die meisten Säugetierzellen auf eine stabile Zell-Oberflächen Wechselwirkung angewiesen, um eine erfolgreiche Proliferation zu gewährleisten [28].

Zelladhäsionsphase	Phase I	Phase II	Phase III
Schematische Darstellung der zellulären Vorgänge			
Schematische Darstellung der Zellformänderung			
	Initialadhäsion	Abflachen	Vollständige Ausbreitung und strukturelle Reorganisation
Typ der Interaktion	Elektrostatische Interaktion	Integrin-Bindung	fokale Adhäsion
Adhäsionsstadium	Sedimentation	Feste Zellanhaftung	Ausbreitung und Stabilisierung

Abbildung 3: Phasen der Zelladhäsion von eukaryotischen Zellen auf einer artifiziellen Oberfläche, die mit extrazellulärer Matrix (ECM) bedeckt ist. Schematisch dargestellt sind die zellulären Vorgänge und Zellformänderung, sowie die wichtigsten Mechanismen. Abbildung entnommen und übersetzt von Khalili et al. [29].

Die Zelladhäsion von eukaryotischen Zellen kann in drei Phasen unterteilt werden. Die erste Phase umfasst die Initialadhäsion, die zweite Phase bildet das Abflachen der Zelle, die dritte und letzte besteht aus dem Spreiten sowie dem strukturellen Umbau der Zelle. Die Adhäsion beginnt mit der Annäherung der Zelle zur Oberfläche. Genauso wie bei den Bakterien ist die treibende Kraft hierbei Konvektions-Diffusion oder Sedimentation [29]. Suspendierte nicht adhärenente Zellen nehmen zum überwiegenden Teil eine mehr oder minder runde, kugelige Form an, daher ist die initiale Kontaktfläche zwischen Zelle und Oberfläche gering. Der erste Kontakt mit der Oberfläche

wird zum überwiegenden Teil durch physiko-chemische Prozesse vermittelt [29]. Ähnlich wie bei der bakteriellen Adhäsion sind hier die ausschlaggebenden Faktoren van-der-Waals-Kräfte, elektrostatischen Doppelschichtwechselwirkungen und Ionen-Korrelations-wechselwirkungen [30]. Diese rein elektrostatischen Wechselwirkungen bilden sich in Sekunden aus. Es kommt hierbei aber zur Ausbildung von nur wenigen Kontaktpunkten zwischen der Zelle und der Oberfläche, die durch geringe externe Kräfte wieder gelöst werden können [29].

Der Übergang in die nächste Phase hängt von der Substratbeschaffenheit ab. Treten artifizielle Substrate mit biologischen Flüssigkeiten in Kontakt, kommt es zu einer Adhäsion von Proteinen, bevor eine Zelle mit der Oberfläche in Kontakt kommt [31]. Daher wird allgemein angenommen, dass die Zellen durch diese adsorbierte Schicht von Proteinen Fremdoberflächen wahrnehmen und nicht direkt mit der Oberfläche wechselwirken. Die Wechselwirkungen zwischen der Proteinschicht und der Zelle werden durch transmembrane Proteine, sogenannte Integrine mediert [32]. Integrine kommen in allen tierischen Zellen mit Ausnahme von Erythrozyten vor. Sie bestehen aus einer extrazellulären, einer transmembranen und einer intrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne präsentiert Bindungsstellen für spezifische Aminosäuresequenzen, wie zum Beispiel die RGD-Sequenz (Einbuchstabencode - R: Arginin, G: Glycin und D: Asparaginsäure), die unter anderem in der Aminosäuresequenz des Fibronektins mehrfach vorkommt [33]. Die transmembrane Einheit fixiert das Protein in der Zellmembran, lässt aber noch eine räumliche Änderung der Position innerhalb der Membran zu. An die intrazelluläre Domäne können sich weitere Proteine anlagern, über die eine Verbindung zum Zytoskelett aufgebaut wird.

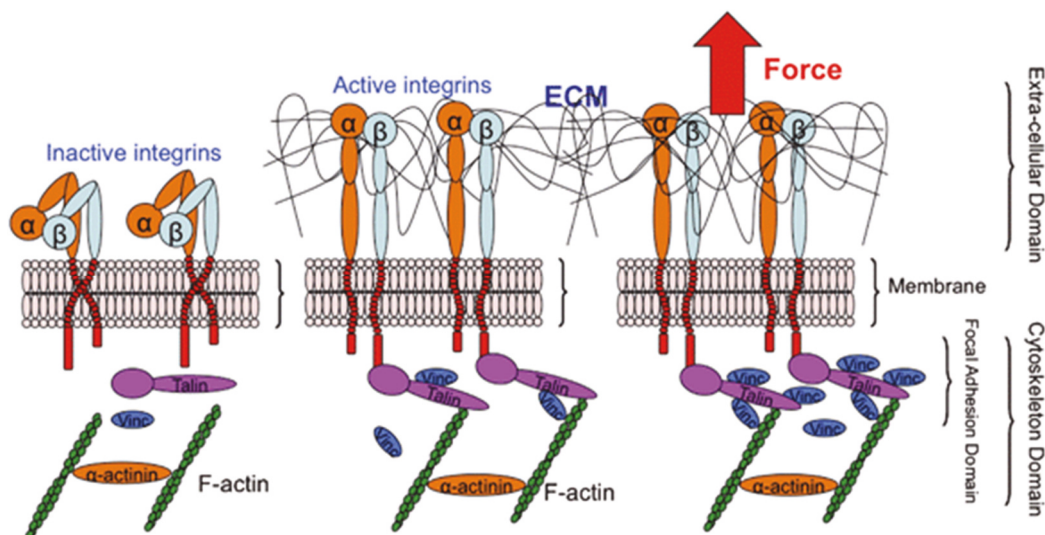


Abbildung 4: Schematische Darstellung von aktivierten Integrinen und Bildung von ECM-Integrin-Zytoskelettbindingen an der fokalen Adhäsionsstelle unter Anwendung einer externen Zugbelastung. Die Zugbelastung führt zu einer vermehrten Bindung von Vinculin (Vinc - lila). Vinculin vermittelt die Bindung an Talin (violett), dass eine Bindung zwischen Integrin und F-Aktin (grün) vermittelt. Entnommen aus Honarmandi [34].

Durch Bindungen zwischen auf dem Substrat präsentierten Proteinen und den Integrinen der Zelle wird die zweite Phase der Zelladhäsion eingeleitet. Aufgrund dieser Intergrin-Proteinliganden-Wechselwirkung kommt es zu einer Aktivierung der intrazellulären Domäne, an diese bindet das zytoplasmatische Protein wie Talin, das wiederum Vinculin rekrutiert und eine Verbindung zum Actin des Zytoskelett aufbaut [34]. Diese ersten Bindungen werden als Fokal-Kontakt bezeichnet. Hierbei sollte angemerkt werden, dass die Aktivierung des Integrins nicht nur durch extrazelluläre Liganden ausgelöst werden kann, sondern dass es auch intrazelluläre Regulationsmechanismen gibt und daher eine dynamische Regulation der Zelladhäsion erfolgt [35]. Die Anzahl der Bindungen nimmt sehr schnell zu, wodurch die Gesamthaftfestigkeit der Substrat-Zell-Wechselwirkung erhöht wird. Dies führt dazu, dass die Zellen auf dem Substrat abflachen und ausbreiten, was morphologisch als Verringerung der Zellhöhe und Vergrößerung der Kontaktfläche erkennbar ist [32].

Die dritte und letzte Phase umfasst das vollständige Ausbreiten und die strukturelle Umorganisation der Zelle. Die Intergrin-Liganden-Bindung löst weitere Prozesse aus, die dazu führen, dass sich die einzelnen fokalen Kontaktpunkte zu Fokal-Komplexen zusammenschließen und weitere Integrine rekrutieren [36]. Dies führt auch zu einer Änderung des Metabolismus durch die Regulation vieler verschiedener intrazellulärer Signalzwischenprodukte wie z.B. Akt/PKB, MAP-Kinasen und kleine GTPasen, was durch integrin-assoziierte Proteine (z.B. Src, FAK, Paxillin und die PINCH-ILK-Parvin-Komplexe) reguliert wird [36].

Neben der durch fokalen Kontakte vermittelten Zelladhäsion gibt es einen weiteren Zelladhäsionsmechanismus, der eine schwache bis mittlere Adhäsion ermöglicht, auf die kurz in diesem Abschnitt eingegangen wird.

Die „rolling cell adhesion“ (dt. rollende Zelladhäsion) tritt im Blutkreislauf auf und bietet eine reversible, dynamische Bindung, bei der mobile Zellen durch Rollen und Anhaften an der Endothelwand aus dem Blutstrom entweichen können [37]. Daher können diese Zellen ihre Stoffwechsell Aufgaben, wie z.B. Entzündungsreaktionen, erfüllen und schließlich in den Blutkreislauf zurückkehren. Der Prozess der „rolling cell adhesion“ wird durch die Interaktion von Selektinen mit glykosylierten Liganden ausgelöst. Entzündliche Endothelzellen exprimieren zudem E- und P-Selektine, die die Anheftung von Leukozyten über z.B. das Protein P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL1) ermöglicht [37].

2. Stand der Technik und Forschung

2.1. Methoden zur Untersuchung der Zelladhäsion

2.1.1. Einteilung der Methoden

Zelladhäsion kann mit verschiedensten Methoden untersucht werden. Die Methoden lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen, die Messung von Bindungsereignissen und die von Ablösungsereignissen (Abbildung 5). Bei den Methoden, die Bindungsereignisse untersuchen, wird die Bindungsbildung von einer oder mehreren Zellen an ein Substrat detektiert [29]. Hingegen detektiert die zweite Hauptgruppe die Lösung von etablierten Bindungen zwischen einer Zelle oder Zellen und dem Substrat durch das Applizieren einer externen Kraft. Die beiden Hauptgruppen unterteilen sich wiederum in Untersuchungen auf Einzelzell- und Zellpopulationsebene.

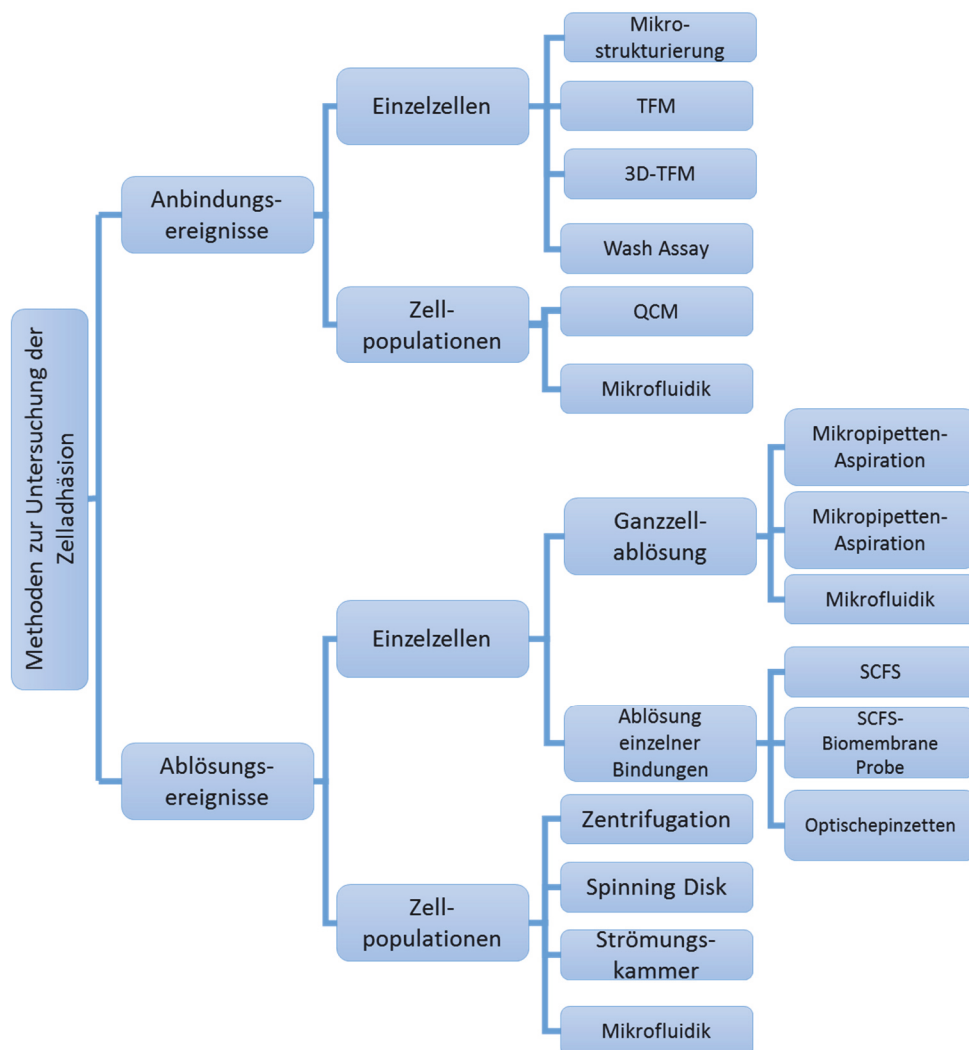


Abbildung 5: Kategorien, in die die verschiedenen Methoden zur Untersuchung von Zelladhäsion unterteilt werden können. Entnommen und übersetzt aus Khalili [29].

2.1.2. Detektion der Bindungsereignisse

a) Der „wash assay“

Eine experimentell wenig aufwändige Methode zur Messung von Bindungsereignissen auf Zellpopulationsebene ist der „wash assay“ oder „plate-and-wash assay“². Bei diesem Verfahren werden meist Zellkulturgefäßoberflächen mit unterschiedlichen Konzentrationen und Arten von Beschichtungen beschichtet, z.B. ECM-Liganden [38]. Suspendierte Zellen werden auf diesen Oberflächen ausgesät und nach einer definierten Zeit (Minuten bis mehrere Stunden) die „nicht haftenden“ Zellen durch Waschen entfernt. Die restlichen Zellen werden durch Zählen oder durch Verwendung eines farbstoffbasierten Assays mit Fluoreszenz spektroskopisch automatisiert quantifiziert. Dieses Verfahren ist einfach und kostengünstig, hat aber eine geringe Reproduzierbarkeit und liefert keine Daten über die Stärke der Bindungskräfte [38].

b) Auf akustischer Resonanzfrequenz basierende Methoden

Eine weitaus exaktere Messung von Bindungsereignissen auf Zellpopulationsebene bieten auf akustischer Resonanzfrequenz basierende Methoden. Hierfür werden piezoelektrische Resonatoren als Sensoren eingesetzt. Die Quarzkristall-Mikrowaage (QCM) ist einer der am weitesten verbreiteten piezoelektrischen Biosensoren für die Untersuchung der Zelladhäsion und Zellspreitung [39]. Als Sensor wird ein Schwingquarz, der aus einem dünnen Quarzkristall (AT-Schnitt) geschnitten und über zwei Metallelektroden auf der Ober- und Unterseite kontaktiert ist, eingesetzt [39,40]. Die Resonanzfrequenz des Sensors ändert sich, wenn sich eine Fremdmasse an die Oberfläche des Sensors haftet und die Massenbelegung der Oberfläche geändert wird [40].

Für die Messung von Zelladhäsion kann der Sensor mit verschiedensten dünnen Schichten, wie z.B. Metallen, ECM-Komponenten etc. beschichtet werden. Nach Aussaat der Zellen auf der Sensoroberfläche konnten Veränderungen der Resonanzfrequenz bei den Wechselwirkungen zwischen der Zellmembran und dem Substrat sowie bei den Veränderungen der partiellen Oberflächenabdeckung durch die Zellen festgestellt werden [41–44]. Der Adhäsionsprozess und die molekularen Wechselwirkungen erzeugen Signale, die die vom Sensor bestimmte Zelladhäsionskinetik darstellen. Diese Technik ist in der Lage, die Zellanhaftung und Ausbreitung von Zellen auf einer bestimmten Oberfläche quantitativ und in Echtzeit zu überwachen[45–47].

c) Weitere Methoden zum Untersuchen von Zell-Oberflächen Bindungsereignissen

Weitere Methoden zur Untersuchung von Zell-Oberflächen-Bindungsereignissen auf Zellpopulationsebene stellen mikrofluidische Systeme dar. Hierbei werden kontinuierliche

² dt. Waschtest bzw. -Platier-und-Waschtest

Fluidströmungen während der Adhäsion angelegt, um über die Flussgeschwindigkeit eine definierte Scherkraft auf die Zellen auszuüben. Fu et al. [48] zum Beispiel untersuchten die Adhäsion von Tumorzellen an die Endothelzellschicht unter Scherfluss durch Kombination der „micro particle image velocimeter“ (μ PIV) in einem mikrofluidischen System, um die Wechselwirkungen zwischen Leukozyten und Tumorzellen in der Nähe der Endothelwände zu verstehen.

Auf Einzelzellebene ist „traction force microscopy“ (TFM) die am weitesten verbreitete Technik, um Zell-Oberflächen-Bindungsereignisse zu untersuchen. Mit dieser Technik kann die Kraft, die von Zellen durch den Kontakt mit der Substratoberfläche ausgeübt wird, untersucht werden. Hierzu werden die Zellen auf Polyacrylamidgelen kultiviert, die fluoreszierende Partikel, die in der Nähe der Geloberfläche eingebettet sind, enthalten [49]. Zugkräfte, die von Zellen erzeugt werden, bewegen die Partikel. Die Bewegung kann durch Verfolgung der Verschiebung der fluoreszierenden Partikeln quantifiziert werden [49–51]. Die Verschiebung kann, da die elastischen Eigenschaften des Gels bekannt sind, in eine Kraft umgerechnet werden. Die 3D-TFM-Technik verwendet 3D-Matrizen wie Agarose, Kollagen, Hyaluronsäure, Fibrin oder Matrigel für die Zellkultur und erweitert die Kraftmessung auf eine räumliche Ebene [29]. Hierzu werden einzelne Zellen innerhalb der Gelmatrix gezüchtet, die mit fluoreszierenden Partikeln umgeben ist. Die Partikelverteilung im 3D-Gel wird beobachtet, um die zellulären Kontraktionskräfte einzelner Zellen während der Migration abzuschätzen [52–55]. Weiter ist es möglich, durch Mikrostrukturierung Oberflächen mit Mikrosäulen oder anderen Strukturen zu modifizieren. Diese werden durch die von den Zellen ausgeübten Kräfte deformiert, was wiederum eine Quantifizierung der Kräfte ermöglicht [56].

2.1.3. Detektion der Lösung von Zell-Oberflächen Bindungen

Die nachfolgenden Methoden betrachten die Dissoziation der Zell-Oberflächen-Bindungen. Dies geschieht durch das Anlegen einer externen Kraft, die auf die Zellen wirkt, die so groß ist, dass die Zelle oder einzelne Bindungen von der Oberfläche gelöst werden. Auch hier unterscheidet man zwischen Messungen auf Populationsebene und auf Einzelzellebene.

a) Hydrodynamische Scherkraftassays zur Zellablösung

Es gibt drei Haupttechniken, eine gut definierte laminare Strömung anzuwenden, um hydrodynamische Scherkraft auf die Zellen zu erzeugen: die Spinnscheibe, die radiale Strömungskammer und die parallele Plattenströmungskammer [57]. Einer der ersten

hydrodynamischen Scherkraftassays zur Zellablösung ist der „spinning disc assay“³. Hierzu werden Zellen zunächst auf scheibenförmiges Substrate gesät. Diese Scheiben werden nach einer definierten Kultivierungszeit in eine mit Pufferlösung gefüllten Kammer überführt, die auf einer rotierenden Vorrichtung befestigt ist [58,59]. Die Rotation (typische Rotationsgeschwindigkeit: 500 bis 3000 U/min) erzeugt Scherkräfte auf die Zellen an der Oberfläche in Abhängigkeit von der Dichte, der Viskosität des Fluids sowie der Winkelgeschwindigkeit der Scheibe und dem Abstand jeder einzelnen Zelle zur Mitte der Scheibe [60]. Die anhaftenden Zellfraktionen werden im Allgemeinen mikroskopisch durch Zählen der Anzahl der Zellen vor und nach dem Schleudern entweder mit einem manuellen Verfahren oder einer automatisierten Bildverarbeitungssoftware quantifiziert [61]. Der Rotationsscheibentest wurde verwendet, um verschiedene Arten von Zell-Substrat-Wechselwirkungen für ein breites Anwendungsspektrum zu untersuchen, wie z.B. die Quantifizierung der Adhäsionskraft einer osteoblastenähnlichen Zelle auf modifiziertem Glas, menschliche Knochenmarkzellen auf Hydroxylapatit und MC3T3-E1-Zellen auf RGD-Peptiden, sowie auf selbst anordnenden Monoschichten (SAMs) [62–64].

Die weiteren Verfahren basieren hauptsächlich auf durch aktiven Flüssigkeitsstrom erzeugte Scherkräfte. Im Fall der radialen Strömungskammer strömt Flüssigkeit von der Mitte aus in das kreisförmige Substrat ein und breitet sich über die Oberfläche aus. Der Flüssigkeitsstrom erzeugt Scherkräfte die auf die am Boden der Kammer adhären Zellen wirken. Es entsteht ein Gradient, da die Scherkräfte mit zunehmendem Radialabstand zum Einlass abnehmen [65]. Die maximal erzeugbaren Kräfte liegen unter 200 μN , daher ist die Anwendung auf kurzzeitige Adhäsionstests beschränkt. Als Beispiel wurden mit diesem Aufbau die Adhäsion von Osteoblasten an RGD, die CHO-Zelladhäsion (Chinese Hamster Ovaria) an modifizierten Siliziumoxid-Substraten oder die Fibroblastenadhäsion an fibronectinbeschichtetem Glas untersucht [65–68]. Wie bei der radialen Strömungskammer erzeugt eine aktive Strömung in der Parallelplattenströmungskammer Scherkräfte, die auf die Zellen am Boden der Kammer wirken. Die Kammer oder der Kanal besteht aus zwei flachen Platten, die von einer Dichtung umschlossen werden. Zwei Löcher in der oberen Platte dienen als Zu- und Abfluss die Erzeugung des Flüssigkeitsstroms. Die zu untersuchenden Zellen werden in den Kanal injiziert und adhären auf dem Boden der Kammer bei abgeschaltetem Fluss. Durch Applizieren eines definierten Volumenstroms werden die Zellen einer definierten Scherkraft ausgesetzt [69]. Die verursachte Scherbeanspruchung ist innerhalb der Hauptteile des Kanals gleichmäßig, wenn das Seitenverhältnis zwischen Kanalbreite und Kanalhöhe hoch genug ist, und es entsteht ein parabolisches Strömungsprofil [69]. Durch Variation

³ dt. Rotationsscheibentest

der Durchflussmenge können die Scherkräfte reguliert und die Ablösung der Zellen in Echtzeit oder nachträglich mikroskopisch beobachtet werden.

b) Einzelzell-Methoden

Die radiale Strömungskammer und Parallelplattenströmungskammer können, wenn die Ablösung von einzelnen Zellen in Echtzeit überwacht wird, zu den Einzelzell-Methoden gezählt werden. Dagegen sind Methoden wie das mechanische Ablösen einzelner Zellen, die Mikropipetten-Aspirationstechnik oder die SCFS reine Einzelzell-Methoden.

Um Zellen mechanisch abzulösen, wird ein Mikromanipulator eingesetzt, an dem ein Cantilever befestigt ist. Mit der flachen Vorderseite wird eine adhärierte Zelle von der Oberfläche herunter „geschabt“ [59]. Die Biegung des Cantilevers wird wie in einem Atomic Force Microscope (AFM) über die Ablenkung eines Lasers von der Oberfläche des Biege-Balkens (Cantilever) gemessen, dies kann wiederum in eine Kraft umgerechnet werden [59].

c) Einzelzell-Kraftspektroskopie (SCFS)

Eine weitaus präzisere Methode stellt die SCFS dar. Hierbei wird mit Hilfe eines AFM der Kraftverlauf, der benötigt wird, um eine Zelle von einer Oberfläche zu lösen, detektiert [70]. Die Kraft wird über die Auslenkung eines Cantilever gemessen. Da diese Auslenkung sehr klein ist, erfolgt die Messung indirekt über die Ablenkung eines Laser-Strahls von der reflektierenden Oberfläche des Cantilevers [71].

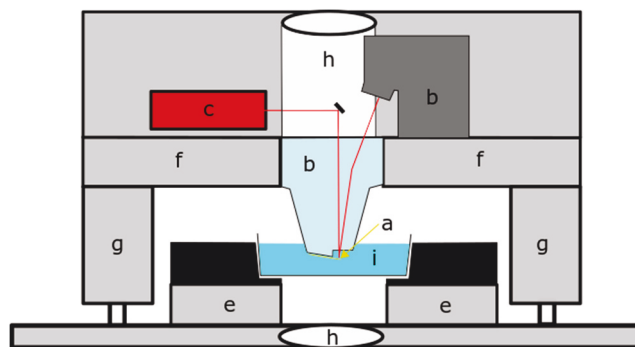


Abbildung 6: Schematische Schnittzeichnung eines AFMs für biologische Fragestellungen. Cantilever (a) am Glasblock (b) fixiert, auf den der Laser-Strahl aus einer Laserdiode (c) fällt. Der Strahl wird von der reflektierenden Cantileveroberfläche reflektiert und trifft auf den Vier-Zonen Detektor (b). Die Piezoantriebe (f) ermöglichen die Bewegung in x, y und z-Richtung und weitere Piezoantriebe (e) erlauben einen erweiterten z-Verfahr-Weg von 100 µm. In den Füßen (g) sind Schrittmotoren integriert, die ein grobes Verfahren über einen mehrere Millimeter großen Bereich in z-Richtung ermöglichen. Durch Strahlengang (h) und den transparenten Glasblock (b) kann während der Messung mit Hilfe eines inversen Mikroskops (nicht dargestellt) die Probe und der Cantilever in der mediumgefüllten Zellkulturschale (i) beobachtet werden.

Ein vier-Quadranten Fotodetektor detektiert die Ablenkung. Für die Umrechnung der Biegung des Cantilevers in eine Kraft muss die Federkonstante des Cantilevers sowie das Verhältnis aus realer

Auslenkung der Cantileverspitze und detektiertem Signal bekannt sein [71]. Die Auslenkung des Cantilevers kann relativ einfach aus einer Abstand-Detektor-Auslenkung-Kurve bestimmt werden, weil der Verfahrensweg in z-Richtung über die Piezoantriebe genau steuerbar ist. Es gibt verschiedene Methoden zur Bestimmung der Federkonstante. Die Federkonstante kann auf Grundlage der Abmessungen und Materialeigenschaften berechnet werden [72]. Dabei ist es messtechnisch schwierig, die exakte Dicke des Cantilevers zu bestimmen. Auch kann durch Anhängen einer bekannten Masse an den Cantilever die Schwerkraftauslenkung und daraus die Federkonstante berechnet werden [72]. Hierbei stellt die Herstellung der exakten Masse wie auch die Fixierung der Masse eine große Herausforderung dar [73]. Weitere Methoden sind z.B. die Auslenkung an einem Cantilever mit bekannter Federkonstante und Messung der Durchbiegung durch Bewegung in einem Medium bekannter Viskosität [73].

Die am häufigsten verwendete Methode ist das thermische Rauschverfahren. Diese Methode bezieht sich auf den Gleichverteilungssatz, der besagt, dass in einem Hamiltonischen System, das sich im thermischen Gleichgewicht befindet, jeder Freiheitsgrad des Systems die gleiche mittlere Energie besitzt, unabhängig von den Massen und anderen Eigenschaften der Teilchen oder von der Zusammensetzung des Systems [74]. In einem generalisierten Koordinatensystem ist die insgesamt vorhandene Wärmeenergie gleich $\frac{k_B T}{2}$, wobei k_B die Boltzmann-Konstante und T die absolute Temperatur (in Kelvin) ist [74]. Wenn man den Cantilever als ideale Feder der Konstante k behandeln kann, ermöglicht eine Messung des thermischen Rauschens in $\langle x^2 \rangle$ -Position die Bestimmung der Federkonstante als:

$$k = \frac{k_B T}{\langle x^2 \rangle} \quad (2.1.1)$$

Da der Cantilever eine nicht ideale Feder ist, müssen weitere Korrekturfaktoren in die Gleichung eingebracht werden, daher gilt:

$$k = \frac{0,8174 \cos^2 \alpha}{s^2 P} k_B T, \quad (2.1.2)$$

wobei s der Sensitivität entspricht, welche dem Kalibrierungsfaktor aus realer Auslenkung des Cantilevers und detektiertem Signal auf dem Photodetektor entspricht (Einheit: m/V). P entspricht der positionellen Rauschleistung um den Punkt der Grundschiwingung (Einheit: V²) [74]. Dieses Verfahren kann sehr einfach vor einer Messung ohne externe Komponenten direkt mit dem AFM durchgeführt werden und wird deshalb überwiegend verwendet. Gegenüber der sehr exakten Schwerkraftauslenkung durch eine externe Masse (Cleveland added-mass method) liegt die Abweichung lediglich bei 5-10 % [73].

Für SCFS muss eine einzelne Zelle am Cantilever immobilisiert werden. Die Bindung zwischen Zelle und Cantilever muss dabei stärker sein als die Kräfte, die zwischen der zu untersuchenden Oberfläche wirken, da sich sonst die Zelle während der Messung vom Cantilever ablöst. Die Immobilisierung geschieht meist durch Beschichtung mit z.B. ECM-Proteinen einschließlich Kollagenen, Lamininen oder Fibronectin, Concanavalin A (ConA) zur Bindung von Kohlenhydraten auf der Zelloberfläche, spezifischen Antikörpern oder einem unspezifischen Haftungsvermittler (z.B. CellTak®, poly-L-Lysin) [70].

Nach der erfolgreichen Immobilisierung der Zelle erfolgt die Aufnahme der Kraft-Abstands Kurve auf der zu untersuchenden Oberfläche. Die Kraft-Abstands Kurven zeigen den Verlauf der Kraft von der Annäherung bis zum vollständigen Ablösen der Zelle in Abhängigkeit vom Abstand zur Oberfläche. Prokaryotische Zellen ohne lange Pili zeigen in den Kraft-Abstands Kurven meist nur einen Peak bei der Ablösung und keine weitere auffällige Kraftänderung [75]. Der Punkt, an dem die Kraft am größten ist, bezeichnet man als MDF (Maximum Detachment Force)⁴. Bei eukaryotischen Zellen hingegen zeigen die Kraft-Abstandskurven nach dem MDF-Punkt im Allgemeinen stufenförmige Ereignisse, die dem Lösen von einem oder mehreren Adhäsionsmolekülen aus dem Substrat entsprechen (Abbildung 7 d,e). s-Ereignisse entsprechen Adhäsionsmolekülen, die über die gesamte Abrisszeit mit dem Zytoskelett fest verbunden sind [70]. Deshalb sind diese Ereignisse durch einen Anstieg der Kraft vor dem Abriss gekennzeichnet, da die Kombination aus Zelladhäsionsrezeptor, Membran und Zytoskelett gestreckt wird und sich dadurch die Kraft auf den Cantilever kontinuierlich erhöht. Bei t-Ereignissen steigt die Kraft nicht an, da die Rezeptor-Zytoskelett Bindung sich während des Retract löst [70]. Diese Ereignisse sind als stufenartige Ereignisse in der Kraft-Abstands-Kurve zu erkennen.

⁴ dt. maximale Ablösungskraft

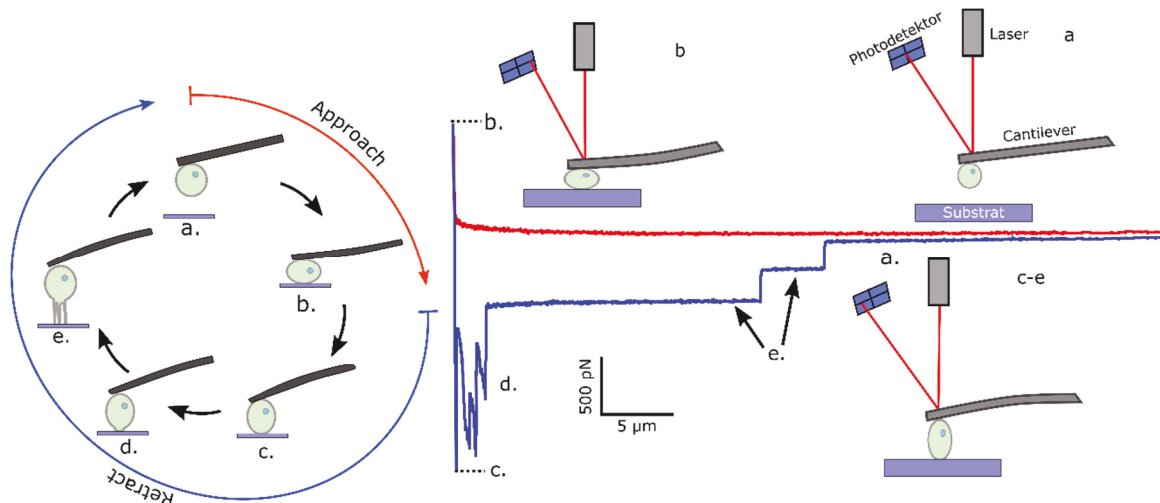


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines SCFS-Messzyklus einer eukaryotischen Zelle (links) und die daraus resultierende Kraft-Abstands-Kurve (rechts). Der Zyklus beginnt, wenn die Zelle keinen Kontakt mit der Oberfläche hat und frei im Medium am Cantilever immobilisiert ist (a). Darauf folgt die Annäherung (Approach) der Zelle an die Oberfläche, bis eine definierte Andruck-Kraft (Set-Point-Force) vom Cantilever auf die Zelle ausgeübt wird (b). Die rote Kurve repräsentiert den Verlauf der Kraft, die auf den Cantilever wirkt. Nach einer definierten Kontakt-Zeit beginnt das Zurückziehen (Retract) des Cantilevers (blaue). Als maximale Abrisskraft (MDF) ist der tiefste Punkt in der Kraftabstandskurve definiert (c). An dieser Stelle ist der größte Teil der Zelle von der Oberfläche gelöst. Diesem Punkt folgen im Allgemeinen stufenförmige Ereignisse, die dem Lösen von einem oder mehreren Adhäsionsmolekülen aus dem Substrat entsprechen (s- und t-Ereignisse durch d und e gekennzeichnet). s-Ereignisse entsprechen Adhäsionsmolekülen, die über die gesamte Abrisszeit mit dem Zytoskelett fest verbunden sind. Bei t-Ereignissen steigt die Kraft nicht an, da die Rezeptor-Zytoskelett-Bindung sich während des Retract löst. Diese Ereignisse sind als stufenartige Ereignisse in der Kraft-Abstands-Kurve zu erkennen (e). Schematische Darstellung abgewandelt und erweitert von Friedrichs et al. [70].

d) FluidFM, eine Erweiterung der traditionellen SCFS

Wie zuvor ausführlich beschrieben, limitiert die Bindungsstärke der für die Immobilisierung benutzten Substanz die maximal messbare MDF, deshalb ist die traditionelle SCFS auf die erste Phase der Initialadhäsion begrenzt. FluidFM®, die die gleiche Kraftmessmethode wie SCFS anwendet, umgeht das Immobilisieren von einer Zelle durch den Einsatz eines mikrofluidischen Cantilevers. Der hohle, mikrofluidische Cantilever ist mit einem Pumpsystem verbunden (Aufbau siehe Abbildung 8). Durch ein Loch in der Spitze kann die Zelle durch Unterdruck an den Cantilever mechanisch gebunden werden, wodurch wesentlich höhere Anbindungs bzw. Immobilisierungskräfte auf einzelne Zellen ausgeübt werden können [76,77]. Ursprünglich wurde dieses zur Mikroinjektion von Farbstoffen in einzelne lebende Zellen und sogar in ausgewählte subzelluläre Strukturen eingesetzt [77]. Erstmals zeigten Potthoff et al. [76], dass die sehr hohen Immobilisierungskräfte zwischen dem Cantilever und einer vom Pumpsystem angesaugten Zelle genutzt werden können, um die Zelladhäsionskräfte auch nach der vollständigen Reifung der fokalen Kontakte zu lösen. Auch war es mit diesem Aufbau möglich, die MDFs von stark adhären Zellen zu messen [76,78].

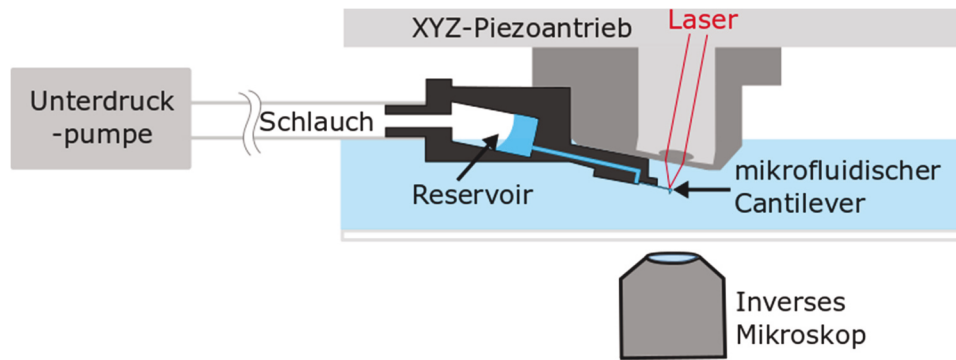


Abbildung 8: Schematischer Aufbau der FluidFM-AFM-Erweiterung. Gezeigt wird der mikrofluidische Cantilver mit Haltevorrichtung. Für den gesamten AFM Aufbau sei auf die Abbildung 6 verwiesen. ⁵

2.1.4. Methodenübersicht

Die große Anzahl von verschiedenen Methoden zeigt, dass Zelladhäsionsmessungen ein integraler Bestandteil auf dem Weg zu einem besseren Verständnis von Zell-Substrat-Wechselwirkung ist. Jede dieser Methoden hat Vor- und Nachteile (siehe Tabelle 1). Welche Methode zur Anwendung kommt, hängt von der Fragestellung ab. Für eine genaue Analyse der initialen Zelladhäsion ist SCFS eine geeignete Methode. Dabei kann genau (mit pN-Auflösung) der Abriss einer einzelnen Zelle verfolgt werden. Durch den Einsatz von FluidFM® erweitert sich der Anwendungsbereich auf alle Phasen des Zelladhäsionsprozesses. Daher halte ich diese Methode (SCFS und FluidFM) für die richtige Wahl, um einen Ansatzpunkt für die Beeinflussung der Initialadhäsion (wie auch Langzeitadhäsion) auf künstlichen Substraten zu finden.

⁵ Als Vorlage für die Abbildung diente: <https://www.nanosurf.com/en/products/flex-fpm-flexafm-with-fluidfm-functionality>

Tabelle 1a Übersicht der Vor und Nachteile der Methoden zur Untersuchung der Zelladhäsion. Erweitert und angepasst von Friedrichs et al. [70].

Methoden	applizierte Kraft	Quantifizierungsmethode	Vorteile	Nachteile	Ref.
plate-and-wash assay	ungleichmäßige / unbekannte Scherkräfte	Verhältnis von adhären zu nicht adhären Zellen	geringer Kostenaufwand, einfacher experimenteller Aufbau	geringe Reproduzierbarkeit, keine quantitativen Daten, nur relative Ergebnisse	[79–81]
Quarzkristall-Mikrowaage (QCM)	direkte Messung der Interaktion (keine externe Kraft nötig)	Änderung der akustischen Impedanz aufgrund von Massenbelegung/ Adsorbateigenschaften	nicht invasive Methode, keine externe Kraft nötig, Echtzeitüberwachung, kleine Bauform des Sensors	Interpretation der Daten, keine Ausgabe von Kräften, wenige kommerzielle Geräte	[82–84]
TFM (traction force microscopy)	direkte Messung der Interaktion (keine externe Kraft nötig)	Auslenkung von Mikrostrukturen in Matrices bekannter Elastizität	genaue Analyse des Zelloberflächenkontakts, Auswertung von Zellpopulation/ Einzelzellen	Beschränkte Substratauswahl, komplexe Auswertung, Homogenität der Matrices	[85]
Hydrodynamischer Schwerkraft Assays	Scherkräfte (teilweise laminarer Fluss)	Verhältnis von adhären zu nicht adhären Zellen, Analyse von rollender Zelladhäsion (Bindungsfrequenz, Haltezeit)	einfacher Aufbau, kommerziell erhältlich, großer Kraftbereich	keine exakte Kraftmessung, Scherkräfte zellformabhängig	[86–89]
Spinning-disc assay	Scherkräfte (linearer Kraftgradient)	Radius, an dem 50 % der Zellen noch adhären sind	hohe Reproduzierbarkeit, hoher Durchsatz möglich, großer Kraftbereich	Scherkräfte Zellformabhängig	[61,90]
Mikropipetten Aspirations-technik	Zugkraft (Ansaugen)	Zellablösung bei bestimmtem Saugdruck		nicht kommerziell erhältlich, beschränkt auf hohe Kräfte, niedrige Kraftauflösung, Zellform ändert sich während der Aspiration	[91,92]
Optische Pinzetten	Zugkraft	Messung der Ablösekräfte (0.1 - 200 pN)	hohe Auflösung der Kräfte	komplexer Aufbau, geringe Ablösekräfte applizierbar	[93,94]

Tabelle 1b: Fortführung - Übersicht der Vor und Nachteile der Methoden zur Untersuchung der Zelladhäsion.
Erweitert und angepasst von Friedrichs et al. [70].

Methode	applizierte Kraft	Quantifizierungsmethode	Vorteile	Nachteile	Ref.
SCFS (single cell force spectroscopy)	Zugkraft	Messung der Ablösekräfte (10 pN – 1 µN)	hohe Auflösung der Kräfte, hohe Ablösekräfte applizierbar, Kontrolle des Zell-Oberfläche-Kontakts, kommerziell erhältlich	zeit- und kostenintensiv	[95–97]
FluidFM®	Zugkraft	Messung der Ablösekräfte (10 pN – 100 mN)	keine Beschichtung des Cantilever nötig, hohe Immobilisierungskräfte	zeit- und kostenintensiv	[76,78]

2.2. Zell-Substratwechselwirkung

2.2.1. *In-vitro* -Substratbeschichtungen

Viele experimentelle Arbeiten in der Molekularzellbiologie erfordern die Kultivierung von immortalisierten Zelllinien, aber auch von Primärzellen. Das in der Zellkultur am häufigsten verwendete Substrat besteht aus Kunststoffen, die eine negativ geladene Oberfläche präsentieren [98]. Ein Nachteil dessen ist, dass einige Zelltypen nicht genügend positiv geladene extrazelluläre Matrixproteine besitzen und daher nur in geringem Maße auf den Kunststoffsubstraten haften [99]. Oft ist deshalb eine Vorbeschichtung der Kunststoffoberfläche mit extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen, Fibronectin, Laminin etc. nötig, die in der Regel die Bindung solcher Zelltypen verbessern [100]. Diese Proteine präsentieren spezifische Sequenzen, an die die Zellen wiederum durch spezifische Integrine binden, die in den Zellmembranen der Zellen verankert sind. Die bekannteste ist die RGD-Sequenz des Fibronectins. Sie stellt die Minimalsequenz dar, die nötig ist, um eine zelladhäsionfördernde Wechselwirkung zwischen Integrinen und Matrixproteinen auszulösen. Die spezifische Bindung findet an einer umfangreichen Zahl von verschiedenen Integrin-Untereinheiten statt (Abbildung 9) [101].

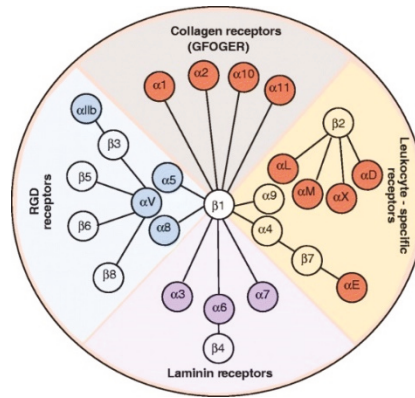


Abbildung 9: Unterteilung der Integrin-Untereinheiten die spezifisch Bindung an Kollagen, RGD enthaltenen Proteinen und an Leukozyten Rezeptoren induzieren. Entnommen aus Barczyk [101].

Längere spezifische Bindungssequenzen sind bei Kollagen und Laminin zu finden und umfassen sechs (GFOGER) und fünf (YIGSR) Aminosäuren. Je nach Zelltyp fördern nur bestimmte Peptidbeschichtungen die Zelladhäsion wie auch die Proliferation, da die Zusammensetzung und Anzahl der Integrine stark variieren kann. Bei neuronalen Zellen zum Beispiel ist Laminin ein wichtiger Faktor, der die Adhäsion fördert, aber auch die Proliferation der Zellen positiv beeinflusst [102]. Knochen- bzw. Gewebszellen wie Osteoblasten-, aber auch Fibroblasten-Zelllinien können oft direkt auf Zellkulturkunststoffen ausgesät werden.

Die extrazellulären Matrixproteine müssen sich fest an das Substrat binden, damit sich die Zellen nicht durch externe Kräfte, die bei der Handhabung auftreten, wieder samt der Beschichtung von der Substratoberfläche lösen. Daher werden zur Verstärkung der Wechselwirkungen häufig geladene Polymere wie PEI (Polyethylimin), PDL (Poly-D-Lysin) und PLL (Poly-L-Lysin) eingesetzt [103]. PEI ist ein organisches Polymer mit einer hohen Dichte an protonierbaren Aminogruppen. Im physiologischen pH-Bereich ist ein Großteil dieser Aminogruppen protoniert. Diese positive Ladung ist nicht ausschließlich für die Bindung an negativgeladenen Oberflächen verantwortlich, sondern es spielen auch nicht-elektrostatische Wechselwirkungen hierfür eine Rolle. PEI umfasst eine Familie von verschiedenen Polymeren, die aus den gleichen Untereinheiten aufgebaut sind, sich aber im Verzweigungsgrad und in der Länge unterscheiden. Neben der Verstärkung der Substratanbindung der Zellkulturbeschichtungen werden diese Polymere auch direkt als adhäsions-verbessernder Faktor in der Zellkultur eingesetzt [104,105]. Dies gilt auch für PDL und PLL, welche sich nur in ihrer Chiralität unterscheiden. PDL und PLL bestehen aus einzelnen Lysin-Einheiten, die über eine Peptidbindung zu einem langen Polymer polymerisiert sind.

In-vitro -Substratbeschichtungen verfolgen zwei Ansätze, die Einführung von positiven Ladungen auf der Substratoberfläche oder das Binden von ECM-Substanzen. Damit fördern sie zum einen die unspezifische Bindung und zum anderen die spezifische Bindung der Zelle.

2.2.2. *In-vivo*-Substratbeschichtungen

a) Orthopädische Implantate

Orthopädische Implantate sind künstlich hergestellte Vorrichtungen, die eine bestimmte Funktion beim Einsetzen in den lebenden Körper ersetzen sollen, die in der Regel durch bestimmte medizinische Indikationen nicht mehr selbst vom Körper erfüllt werden kann. Bei der Herstellung werden oft künstliche, nicht lebende Materialien verwendet. Dafür müssen diese die Eigenschaften eines Biomaterials haben. Das heißt, sie müssen den Einflüssen der biologischen Umgebung widerstehen können und dürfen den Organismus nicht schädigen [106]. Der überwiegende Teil kommerziell verwendeter Implantate besteht häufig aus Titanlegierungen. Titanlegierungen werden verwendet, da sich im Kontakt mit dem Luft-Sauerstoff in sehr kurzer Zeit eine Oxidschicht ausbildet. Diese Oxidschicht ist sowohl biokompatibel als auch bioaktiv [107]. Daher bilden solche Implantate eigenständig eine Beschichtung ihrer Oberfläche. Neben weiteren relativ harten Materialien, wie rostfreien Stählen, Kobalt-Chrom-Legierungen sowie Keramiken werden auch weichere Kunststoffe wie Polyethylen (PET) und Polymethylmethacrylat (PMMA) je nach funktioneller Anforderung allein oder in Kombination eingesetzt [108].

Die Hauptursachen für das Versagen von orthopädischen Implantaten sind die Ansiedlung eingebrachter oder zirkulierender Bakterien und die sogenannte aseptische Lockerung durch nicht optimale Osseointegration [2]. Als Osseointegration bezeichnet man den direkten strukturellen und funktionellen Verbund von Implantat und umliegendem Knochengewebe [109]. Häufig wird versucht, die Osseointegration passiv durch Strukturierung oder Beschichtungen mit osteokonduktiven Substanzen wie Hydroxylapatit zu verbessern [110]. Neben diesen passiven Beschichtungsmethoden werden auch Substanzen auf die Oberfläche gebracht, die aktiv die Bindung und Proliferation positiv beeinflussen. Solche osteoinduktiven Beschichtungen präsentieren zum Beispiel die oben beschriebene RGD-Sequenz oder setzen „bone morphogenic proteins“ (BMPs) frei [111,112]. Um eine Infektion aufgrund von Bakterien-Adhäsion auf der Implantatoberfläche zu verhindern, kommen antimikrobielle Substanzen zum Einsatz. Hierfür wird auf die Oberfläche ein mikroporöses Material aufgebracht, aus dem über einen gewissen Zeitraum Antibiotika freigesetzt werden [2]. Die routinemäßige Anwendung ist auf grund des Risikos der Vermehrung antibiotikaresistenter Pathogene jedoch bisher nicht vorgesehen. Eine weitere Möglichkeit bietet die Beschichtung mit Schwermetallen wie Kupfer oder Silber, die eine zytotoxische Wirkung zeigen [2]. Auch dieses kommt nicht routinemäßig zur Anwendung, da Schwermetalle nicht selektiv für Bakterien sind und auch den Organismus schädigen können. Ein

ganz anderer Ansatz basiert auf dem „race for the surface“-Prinzip⁶. Somatischen Zellen, die um den Lebensraum auf der Implantatoberfläche mit den Bakterien konkurrieren, soll ein signifikanter Vorteil bei der Besiedelung eingeräumt werden [113,114]. Bakterien dagegen sollen daran gehindert werden, auf der Oberfläche zu adhären. Die Entwicklung solcher Oberflächen erweist sich als eine große Herausforderung, da Bakterienadhäsion weniger spezifisch ist.

b) Andere medizinische Implantate

Neben den orthopädischen Implantaten müssen andere medizinische Implantate die Adhäsion von bestimmten Zelltypen spezifisch fördern. Ein Beispiel sind hierbei künstliche Herzklappen. Über Jahre hinweg wurde hierfür an nicht adhäsiven Oberflächen geforscht. Dieser Ansatz wird nur noch eingeschränkt verfolgt. Heutzutage ist der allgemeine Ansatz in der Forschung die Beschichtung der Oberflächen mit Substanzen, die spezifische körpereigene Zellen rekrutieren und damit natürliche zellabweisende Eigenschaften erhalten [115,116]. Im Fokus steht in diesen ersten Schritten das Entwickeln von Materialien, die sich modifizieren lassen, aber auch den mechanischen Beanspruchungen standhalten sowie die geforderten Eigenschaften an Elastizität aufweisen.

Bei elektrisch aktiven Implantaten wie z.B. Tiefenhirnstimulations- (DBS) oder Cochlea-Implantaten kann die Kopplung der Signale zwischen Zellen und Elektrode durch Oberflächenbeschichtungen verbessert werden. Aus Tierexperimenten ist bekannt, dass die Effektivität der DBS Wochen nach der Implantation der Elektrode abnimmt und die elektrische Signalstärke erhöht werden muss. Es wird davon ausgegangen, dass die Anlagerung von Proteinen und Zellen hierfür verantwortlich ist [117]. Im Fall der Cochlea-Implantate wurde gezeigt, dass durch die Immobilisierung von proteinabstoßenden Molekülen die Adhäsion von Fibroblasten reduziert werden kann, was in der klinischen Anwendung von Vorteil ist, da die Zelladhäsion die Impedanz der Elektrode erhöht [3,117].

⁶ dt. „Wettkampf/Rennen um die Oberfläche“

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Gerät	Hersteller
CO ₂ Inkubator (5 % CO ₂)	SANYO (Panasonic), Hamburg, Deutschland
CO ₂ Inkubator (10 % CO ₂)	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Schüttelinkubator	N-BIOTEK Co., Ltd., Gyeonggi-Do, Korea
Plasmareiniger	Zepto LF, Diener Electronic GmbH, Ebhausen, Deutschland
UV-C-Ozon-Leuchtstoffröhre	Dinies Technologies GmbH, Villingendorf, Deutschland
AFM-Mikroskop (mit Fluoreszenzeinheit)	Axio Observer A1 Mikroskop, Zeiss, Oberkochen, Deutschland
AFM	Nanowizard 2, Brucker (ehem. JPK), Berlin Deutschland
SCFS-Modul zu Erweiterung des Z-Verfahrweges	Cellhesion-Module, Brucker (ehem. JPK), Berlin Deutschland
Petri-Schalen-Heizer	Petri-Dish heater, Brucker (ehem. JPK), Berlin Deutschland
FluidFM®	Cytosurge AG, Glattbrugg, Schweiz
Flex-FPM-System	Nanosurf GmbH, Langen, Deutschland
Sputteranlage	Ardenne LA-320S, Von Ardenne GmbH, Dresden, Deutschland
pH-Meter	pH-Meter Five Easy/ InLab Mikro-pH-Elektrode, Mettler Toledo, Gießen, DE
Zeta-Potenzial-Messgerät für Oberflächen	SurPASS™ 3, Anton Paar, Graz, Österreich
Zeta-Potenzial-Messgerät für Partikel	Zetasizer Pro, Malvern Panalytical GmbH, Kassel, Deutschland
Fräsbohrplotter	CCD/2, Fa. BUNGARD Elektronik GmbH & Co. KG, Windeck, Deutschland
Kontaktwinkelmessgerät	OCA 20, DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Deutschland
Pikosekundenlaser	TruMicro 5x50, TRUMPF, Ditzingen, Deutschland

3.1.2. Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Zellkulturflaschen T25	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Zellkulturplatten (12 & 6-Well)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Zentrifugenröhrchen (15 ml & 50 ml)	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
SCFS-Cantilever Arrow TL-1	Nanoworld, Neuenburg, Schweiz
AFM-Cantilever PNP-DB (#1 - 0,48 N/m)	Nanoworld, Neuenburg, Schweiz
FluidFM®-Cantilever (spitzenlos)	Cytosurge AG, Glattbrugg, Schweiz
Glasdeckgläschen (12 & 32 mm)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Zellkulturschale (34 mm ø oder 9,2 cm ²)	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Einmal-Impföse 10 µl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

3.1.3. Chemikalien und Zellkulturmedien

Substanz bzw. Medium	Hersteller
Kasein-Soja-Pepton-Brühe	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kasein-Hefepepton-Agarplatten	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
α -Minimum Essential Medium (α -MEM)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit hohem Glukoseanteil	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Pferdeserum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Dopaminhydrochlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Terg-a-zyme®	Alconox, Inc., White Plains, NY, USA
Analysenwasser	ROTI PURAN, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Accutase®	Innovative Cell Technologies, Inc., San Diego, CA, USA
Polyethyleneimine (PEI) (Mw 750.000, P3143)	Sigma Aldrich, St. Louis, CA, USA
Poly-D-Lysin (PDL) (Mw 70.000-150.000)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Laminin-111	Roche Diagnostics GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Kollagen A	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Menschliches Plasma-Fibronektin (Kat. Nr. FC010)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Anti-Laminin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Anti-Rabbit-IgG-Mega 485	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
AlexaFluor 555-konjugiertes Phalloidin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DAPI	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Polyvinylalkohol (PVA)	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Titanoxid (TiO ₂)	Fluka, Buchs, Schweiz
LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Assay	Fisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland

3.1.4. Zelllinien und Bakterienstamm

Art	Bezugsquelle
<i>Staphylococcus capitis sub. capitis</i> (Scc)	ATCC 27840, DSMZ, Braunschweig, Deutschland
MC3T3-E1-Zellen	ACC 210, DSMZ, Braunschweig, Deutschland
L929-Zellen	ACC 2, DSMZ, Braunschweig, Deutschland

3.2. Beeinflussung der Adhäsion von gleichgeladenen Oberflächen durch Spermidin in Abhängigkeit vom pH-Wert

Als Modellsystem gleich geladener Oberflächen wurden frisch gespaltene Blätter aus Muskovit-Glimmer und sphärischen Borosilikatpartikel mit einem Durchmesser von ca. 10 µm verwendet. Über pH 7,0 ist die Ladung dieser beiden Oberflächen weitgehend pH-unabhängig [118]. Die handelsüblichen Borosilikatkugeln wurden an der Spitze eines AFM-Cantilever mit Zweikomponentenklebstoff fixiert. Die Muskovit-Glimmer-Fixierung erfolgte über das Einklemmen der frisch gespaltenen Glimmer-Plättchen auf dem Boden einer Zellkulturschale. Die Oberflächen wurden mit der jeweiligen Lösung einer Spermidinverdünnungsreihe überschichtet im Anschluss an die Messung von 1000 Kraft-Abstands-Kurven. Für eine detaillierte Beschreibung soll auf Gimsa, Wysotzki et al. [119] verwiesen sein.

3.3. Einfluss von beschichtetem und unbeschichtetem Siliziumnitrid auf die Initialadhäsion von Eukaryoten und Prokaryoten

3.3.1. Zellkultur

a) *Staphylococcus capitis sub. capitis* (Scc)

Für die Experimente wurde ein anspruchsloser prokaryotischer Organismus ausgewählt. Scc ist ein Biosicherheitsstufe-1-Organismus und kann in Standardmedien kultiviert werden, ist aber dennoch von klinischer Relevanz [120]. Dieser grampositive Kokke mit einem Durchmesser von 0,5 - 1,5 µm, ist ein Teil der Hautflora und ist in der Lage, Biofilme zu bilden [120]. Nach dem Auftauen wurden die Bakterien in planktonischer Form in Kasein-Soja-Pepton-Brühe mit 3 % bei 37 °C für 24 h kultiviert. Anschließend wurden Kasein-Hefepepton-Agarplatten mit einer Impföse beimpft und bei 37 °C für weitere 24 h inkubiert.

b) MC3T3

Die osteoblastenartigen MC3T3-E1-Zellen (im Folgenden MC3T3 genannt) wurden aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur bezogen. Sie wurden in 25 cm²-Zellkulturflaschen in α-MEM mit zugesetztem 1 % Penicillin/Streptomycin (Stammlösung: 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin) und 10 % fetalem Rinderserum kultiviert. Der Inkubator gewährleistete 95 % Luftfeuchtigkeit in einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C. Nach einer Inkubation von ca. sieben Tagen wurden die Zellen trypsinisiert (0,05 % Trypsin mit 0,02 % EDTA) und subkultiviert.

c) Murine primäre neuronale Mauszellen (PNZ)

NMRI-Mäuse wurden an Tag 16,5 der Schwangerschaft durch eine zervikale Dislokation getötet. Der frontale Kortex der Embryonen wurde seziiert und für die Zellkultur vorbereitet, wie in Reimer et al. (2012) und Stubbe et al. (2015) beschrieben [121,122]. Die gesammelten Zellen wurden in Zellkulturschalen überführt und in D10-Medium (DMEM-hohe Glukose, 10 % Pferdeserum, 1 % Na-Pyruvat) in einem Inkubator mit 10 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit bei 35,5 °C kultiviert. Ein Subkultivierungsschritt fand statt, um die Kontamination durch unerwünschte Zelltypen während des Präparationsprozesses zu reduzieren.

3.3.2. Beschichtung des Glassubstrats mit Siliziumnitrid

d) Reinigung

Um eine optimale Haftung des Siliziumnitrids gewährleisten zu können, mussten die Oberflächen vor dem Beschichtungsprozess vollständig von Verunreinigungen mit Fetten und anderen Kontaminationen befreit werden. Hierzu wurden die runden 32 mm großen Glasdeckgläser mit Aceton gespült (Abbildung 10a). Als ein weiterer Reinigungsschritt vor der Sputterbeschichtung wurden die Oberflächen mit einer Leistung von ca. 75 W für 180 s plasmabehandelt. Die Luft-Plasmabehandlung entfernt durch die Bildung von Ionen, Radikale, und UV-Strahlung aus dem in der Plasmakammer befindlichen Restgas, die organische Substanzen zersetzen und in die Gasphase überführen. Auch wird durch die entstehende Wärme und auf der Oberfläche auftretende Teilchen das Wasser von der Oberfläche entfernt. Daher wurde die Reinigung kurz vor der Beschichtung durchgeführt.

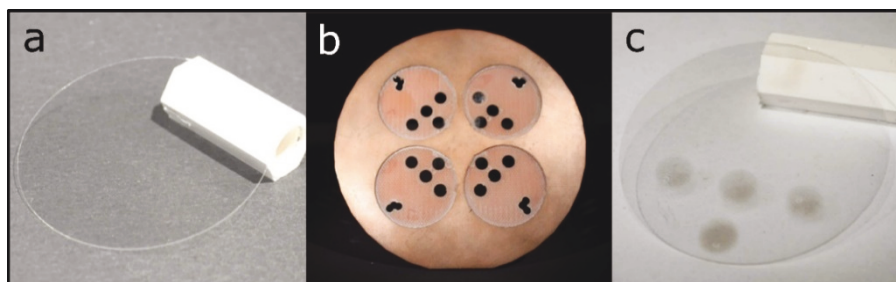


Abbildung 10: Vier Glasdeckgläser (a) werden vor der Beschichtung in die Schattenmaske (b) eingelegt. C zeigt ein beschichtetes Glasdeckglas mit vier getrennten Siliziumnitrid-Oberflächen.

e) Herstellung der Schattenmaske

Eine partielle Beschichtung kann am einfachsten durch eine Schattenmaske erzeugt werden. Eine Schattenmaske deckt die Bereiche ab, die nicht beschichtet werden sollen. Hierzu wurde eine beidseitig kupferkaschierte Platte (Leiterplattenmaterial) mit einem Fräsbohrplotter bearbeitet. Die Fräsdaten basierten auf einer CAD (Computer Aided Design)-Zeichnung die mit Hilfe des CAM (Computer Aided Manufacturing) erstellt wurden. Vier Vertiefungen mit einem Durchmesser von 32,2 mm wurden zur Fixierung der Glasdeckgläser in das Material gefräst. In eine Hälfte jeder der Vertiefungen wurden vier 5 mm große Löcher gefräst (Abbildung 10b). Die Toleranz der Vertiefungen von 0,2 mm gegenüber dem Glasdeckglasdurchmesser war nötig, um einen spannungsfreien Sitz zu gewährleisten und damit Zerschlagen beim Einlegen oder Entnehmen zu vermeiden. Da es sich als sehr schwierig erwies, die beschichtete von der unbeschichteten Seite zu unterscheiden, wurde nachträglich den 5 mm-Löchern gegenüberliegend eine „L“-ähnliche Form eingefräst, um die Identifizierung der beschichteten Seite zu erleichtern.

f) Siliziumnitridbeschichtung mittels physikalischer Gasphasenabscheidung (physical vapour deposition- PVD)

Nach der Reinigung und vor dem Beschichten wurden vier Deckgläser in die Schattenmaske (Abbildung 10b) gelegt und in die Vorkammer der Beschichtungsanlage eingeführt. Nach Schließen der Vorkammer und Erreichen des zum Transfer nötigen Unterdrucks (ca. 10^{-6} mBar) folgte der Transfer in die Hauptkammer. In der Hauptkammer (Rezipient) wurde die Beschichtung durchgeführt. Die Beschichtung geschah mittels Sputterdeposition (ein PVD-Verfahren)⁷.

Im Allgemeinen wird bei der Sputterdeposition ein Inertgas, in diesem Fall Argon, ionisiert. Die Argon-Ionen werden durch ein elektrisches Feld (ca. 1,5 kV) zwischen „Target“ (abzuscheidendes Material) und Substrat (zu beschichtende Oberfläche) beschleunigt und treffen auf das Target. Die kinetische Energie der Argonionen reicht aus, einzelne Molekülen sowie Cluster aus der Substratoberfläche zu schlagen und in die Gasphase zu überführen [123]. Der Dampf scheidet sich auf der Oberfläche ab und bildet eine dünne Schicht (Schichtdicken von wenigen Nanometern bis hin zum unteren Mikrometer Bereich sind hierbei möglich).

Siliziumnitrid ist ein nichtleitendes Material, deshalb wurde RF-Magnetron-Sputterabscheidung gewählt, da auf dem nicht leitenden Target beim DC-Sputtern ein Ladungsaufbau stattfindet, der durch den Einsatz von RF-Sputtern vermieden wird. Für die Versuche wurde bei 200 W für 150 s Siliziumnitrid abgeschieden, was zu einer Schichtdicke von 100 bis 150 nm führte. Eine genauere

⁷ PVD-Beschichtung wurde am „Mikro- und Nanotechnologie elektronischer Systeme am Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik“ der Universität Rostock mit Unterstützung von Herrn Jürgen Josupeit durchgeführt.

Bestimmung der Schichtdicke war nicht möglich, da die Anlage über keinen integrierten Schichtdickensensor verfügte. Bei diesem Schichtdickenbereich war aber gewährleistet, dass die Glasoberfläche vollständig mit Siliziumnitrid bedeckt war.

3.3.3. Beschichtung der Siliziumnitridoberflächen mit Zellkultur-beschichtungssubstanzen

Vor der Polymerbeschichtung wurden mit Siliziumnitrid beschichtete Glasdeckgläser mit 1 %igen Terg-a-zyme®-Lösung gereinigt, mit Analysenwasser gespült und unter einem laminaren Luftstrom getrocknet. Zur besseren Unterscheidung der fast transparenten Siliziumnitridschicht vom angrenzenden Glas wurden die Siliziumnitridoberflächen auf der Unterseite markiert.

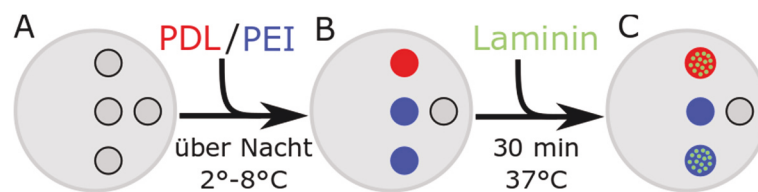


Abbildung 11: Schematischer Ablauf der Beschichtung der Siliziumnitridoberflächen. Die frischen Siliziumnitridspots wurden über Nacht mit Tröpfchen von PEI (rot) oder PDL (blau) (A und B) inkubiert. Vor den Experimenten wurden zwei Flächen 30 min lang mit Laminin (grün) inkubiert (C).

Die erste Schicht wurde durch Zugabe von 5 µl-Tröpfchen von einer PEI⁸- oder einer PDL⁹-Lösung auf die Siliziumnitridpunkte aufgebracht und über Nacht bei 2 - 8°C inkubiert. Nach der Inkubation folgten drei Spülschritte mit Analysenwasser und eine Trocknungsphase. Vor der SCFS-Messung wurde die zweite Schicht durch Zugabe von 5 µl-Tröpfchen Lamininlösung (Laminin-111) auf die Stellen adsorbiert (Abbildung 11 C). Nach 30 min bei 37 °C wurden die Tropfen abgesaugt, die Glasdeckgläser in eine 35-mm-Zellkulturschale gelegt und mit einem kleinen Magneten fixiert. Nicht adsorbiertes Beschichtungsmaterial wurde durch Spülen mit PBS entfernt.

3.3.4. Cantilever-Beschichtung

Um mögliche Verunreinigungen zu entfernen, wurde der spitzenlose Cantilever 300 s lang durch eine UV-Ozonbehandlung (2x 8 W UV-C-Ozon-Leuchtstoffröhre) gereinigt und später vorsichtig in einen 100 µl-Tropfen Karbonatpuffer (pH 8) eingetaucht. Anschließend wurden 2 µl einer frisch angesetzten Dopaminhydrochloridlösung (2 mg/ml DOPA-HCl, 5 % Essigsäure) hinzugefügt. Die Bildung von Poly-Dopamin wurde durch Erhöhung des pH-Wertes in einen stark alkalischen Bereich durch Zugabe von 2 µl Natriumhydroxid (2 M) induziert [124]. Die Lösung wurde 25 min

⁸ 0,05 % PEI in 1 M BORAT-Puffer, pH 8,5

⁹ 0,01 mg/ml PDL in Analysenwasser

lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit einer großen Menge PBS gewaschen. Vor jeder Messung wurde ein neuer, Cantilever mit Poly-Dopamin funktionalisiert.

3.3.5. Vorbereiten der Zellen für die SCFS-Messung

Für die SCFS-Messungen wurden die Zellen nicht durch Trypsin, sondern mit Accutase abgelöst. Der Vorteil von Accutase im Gegensatz zu Trypsin besteht darin, dass die Oberflächenproteine in einem weniger starkem Maße beeinflusst werden. Daher wird dieses Gemisch aus proteolytischen und kollagenolytischen Enzymen häufig für SCFS-Messungen eingesetzt. Zum Ablösen der Zellen wurden die adhärennten Zellen mit ca. 500 µl Accutase-Lösung überschichtet und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und in 5-10 ml PBS je nach Zellzahl resuspendiert.

Im Fall der Scc-Zellen erfolgte die Ablösung durch Überschichten der Platte mit PBS und vorsichtigem Lösen der Zellen mit einer Einmal-Impföse. Etwa 100 µl dieser Bakteriensuspension wurden in 5-10 ml PBS gelöst.

3.3.6. Immobilisieren der Zellen am Cantilever

Vor Beginn der Messung wurde das frisch beschichtete Glasdeckglas mit PBS überschichtet. Eine Temperierung der Lösung auf 37 °C erfolgte durch den „Petri-dish-heater“, der einen Teil des AFM darstellte.

Kurz nach dem Hinzufügen der Zellsuspension auf der den Siliziumnitridoberflächen abgewandten Seite wurde der Cantilever über eine sedimentierte Einzelzelle ausgerichtet. Etwa 30 Sekunden lang wurde leichter Druck durch den Cantilever auf die Zelle mit einer Kraft von 2 bis 6 nN ausgeübt, bevor dieser vollständig zurückgezogen wurde. Um einen festen Kontakt zwischen der Zelle und dem Cantilever zu gewährleisten, wurde sie 10 Minuten in dieser Position ruhen gelassen.

3.3.7. Messablauf

Die frisch angebrachte Zelle wurde über der reinen Siliziumnitridoberfläche ausgerichtet, um ihre individuelle Referenz-MDF zu bestimmen. Zwanzig Kraft-Abstands-Kurven wurden mit einer zufällig gewählten Kontaktzeit von 1, 2 oder 5 s aufgezeichnet, bevor eine anders beschichtete Oberfläche zufällig ausgewählt und zwanzigmal mit der gleichen Kontaktzeit angetastet wurde. Um sicherzustellen, dass jede Kurve an einer noch nicht mit einer Zelle in Berührung gekommenen Beschichtungsstelle aufgenommen wurde, wurde der Cantilever für jede neue Kraft-Weg-Kurve um 25 µm in einem vordefinierten 5x5-Raster verschoben. Nachdem alle Oberflächen angetastet waren, war ein Messzyklus abgeschlossen. Der nächste Messzyklus begann erneut mit der

Referenzfläche mit einer anderen Kontaktzeit. Nachdem alle Kontaktzeiten und Oberflächen im dritten Zyklus abgetastet waren, wurde die Zelle am Cantilever mikroskopisch überprüft.

Es war nicht immer möglich, komplette Datensätze für alle Oberflächen mit derselben Zelle zu erfassen. Wenn eine Zelle stark abnehmende MDFs für eine bestimmte Beschichtung zeigte, wurde das Experiment abgebrochen. In diesen Fällen beschränkte sich die Datenauswertung auf die Messungen der zuvor gemessenen Beschichtungen. Dies führte zu einer höheren Anzahl von gemessenen Zellen auf der Referenzoberfläche.

3.3.8. Bestimmung der Laminin-Konzentration auf Polyethyleneimine (PEI) und Poly-D-Lysin (PDL)

Die Laminindichten wurden mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie auf PEI- und PDL-Basisbeschichtungen qualitativ bestimmt und verglichen. Hierzu wurde das oberflächengebundene Laminin durch einen primären Kaninchenantikörper (Anti-Laminin) gebunden. Der primäre Antikörper wurde durch einen sekundären Antikörper (Anti-Rabbit-IgG-Mega 485) nachgewiesen, der mit einem Fluorophor mit einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 552 nm markiert ist. Die Untersuchung der Fluoreszenzintensitäten der markierten Lamininmoleküle erfolgte unter einem Axio Observer A1 Mikroskop.

3.4. Vergleich von Initial- und Langzeitadhäsion

3.4.1. Zellkultur

Die L929-Zellen wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) kultiviert. Das Medium wurden 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % L-Glutamin und 10 % fetales Rinderserum zugesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C in einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre mit 95 % Luftfeuchtigkeit. Die Zellkultur der MC3T3 erfolgte wie in 3.3.1 b beschrieben.

3.4.2. Kollagenbeschichtung

Um die Oberflächen mit fibrillärem Kollagen Typ I zu beschichten, wurde das Protokoll des Herstellers eingehalten.¹⁰ Zusammengefasst: die Stammlösung von Kollagen A (1 mg/ml in 0,1 % HCl) wurde mit dem gleichen Volumen von 0,3 M NaCl-Lösung verdünnt, was zu einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml führte. Der pH-Wert wurde zwischen 7,0 und 8,0 mit 1 N NaOH eingestellt. Für die traditionellen SCFS-Messungen wurde ein rundes 32-mm-Deckglas teilweise

¹⁰ Coaten von Kulturgefäßen – Anwendungsempfehlung zu Kollagen A - 2. Beschichten von Kulturgefäßen mit fibrillärem Kollagen A, Biochrom AG, Berlin Deutschland

mit einem Tropfen von 10 - 15 μL der Lösung beschichtet. Für die FluidFM®- Messung wurde hingegen die gesamte Oberfläche mit der Lösung überschichtet. Eine Trocknung fand bei Raumtemperatur im Luftstrom einer Laminar Box über Nacht statt. Kurz vor dem Gebrauch wurden die Oberflächen mit Medium oder PBS gespült.

3.4.3. Fibronektinbeschichtung

Menschliches Plasma-Fibronektin wurde in PBS auf 25 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt. Deckgläser mit einem Durchmesser von 12 mm wurden in eine unbehandelte 24-Well-Platte gelegt, bevor 300 μL der verdünnten Fibronektinlösung in jedes Well gegeben und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert wurden. Vor den Experimenten wurden die Deckgläser gründlich mit PBS oder Medium gespült. Das Protokoll unterschied sich bei den traditionellen SCFS-Messungen leicht. Hier wurden die 32 mm Deckgläser nur teilweise mit Tröpfchen von 10 - 15 μL der Lösung beschichtet, bevor sie wie oben beschrieben behandelt wurden.

3.4.4. Einzelzellkraftspektroskopie auf Fibronektin und Kollagen

a) SCFS

Die am Cantilever immobilisierte Zelle wurde auf eine beschichtete oder unbeschichtete Oberfläche ausgerichtet und jeweils 25 Kraft-Abstands-Kurven aufgenommen. Für die Messungen wurde ein Set-Point (Andruckkraft) von 1 nN gewählt. Die Annäherungs- und Rückzugsgeschwindigkeiten wurden auf 5 $\mu\text{m/s}$ und eine Kontaktzeit von 5, 15 oder 30 s eingestellt. Um systematische Effekte zu minimieren, erfolgte die Auswahl der zu untersuchenden Oberfläche randomisiert.

b) FluidFM®¹¹

Die FluidFM® Messungen zur Bestimmung der Langzeitadhäsionskräfte wurden am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde an der Universität Würzburg (Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. Jürgen Groll) von Dr. Ana Sancho durchgeführt.

Hierzu wurden L929- und MC3T3-Zellen auf den unbeschichteten und beschichteten 12-mm-Deckgläsern mit Dichten zwischen 20.000 und 35.000 Zellen/ cm^2 ausgesät. Bei diesen Zelldichten sind die Zellen nicht konfluent und haben noch keinen Kontakt zu benachbarten Zellen. Die Zelladhäsionskräfte im Spätstadium wurden mit einem Flex-FPM-System in Kombination mit der FluidFM® gemessen. Das System ist auf einem inversen Axio Observer Z1 Mikroskop und einem piezoelektrischen Tisch mit einem z-Achsen-Verfahrweg von 100 μm montiert. Die eingesetzten modifizierten Cantilever enthielten einen Mikrokanal, durch den ein Unterdruck über eine Pumpe an einem 8 μm großen, runden Bereich an der vorderen Unterseite angelegt werden konnte. Die

Längen und Breiten der Cantilever betrugen 200 und 36 μm mit einer Nennfederkonstante von 2 N/m.

Für die Messungen wurde ein Cantilever mit 5 $\mu\text{m/s}$ auf die Zelle abgesenkt, bis eine Andruckkraft von 50 nN anlag. In der darauffolgenden Pause von 3 s folgte die Immobilisierung der Zelle an der Öffnung durch Anlegen eines Unterdrucks von -800 mbar. Die Zelle wurde durch das Zurückziehen des piezoelektrischen Tisches zwischen 30 und 95 μm vollständig vom Substrat gelöst. Während der gesamten Messung blieb der Unterdruck angelegt. Die maximale Auslenkung des Cantilevers gab genauso wie bei den traditionellen SCFS die MDF wieder.

3.4.5. Fluoreszenzmikroskopie¹¹

Die auf Deckgläsern gesäten Zellen wurden zunächst 15 min lang mit 4 % Formalin fixiert. Nach gründlichem Waschen mit PBS wurden sie 15 min mit 0,05 % Triton-X100 in PBS permeabilisiert. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBS. Die Proben wurden mit AlexaFluor 555-konjugiertem Phalloidin inkubiert, um F-Actin zu färben. Simultan erfolgte die Färbung der Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol). Die Bilder wurden mit einem inversen Axio Observer Z1 Mikroskop aufgenommen.

3.4.6. Kontaktwinkelmessung an Glas, Kollagen Typ I und Fibronectin ¹¹

Die Benetzbarkeit der Oberflächen wurde mit einem OCA 20 gemessen. Der Kontaktwinkel eines 3 μl -Wassertropfens wurde mit der SCA20-Software berechnet, basierend auf dem Bild, das 5 s nach dem Kontakt des Tropfens mit der Oberfläche aufgenommen wurde, berechnet.

3.5. Einfluss des pH-Wertes auf die Initialadhäsion

3.5.1. Zellkultur

Die Kultivierung der MC3T3-Zellen sowie der Bakterien wich nicht von dem in 3.3.1 (a) beschriebenen Ansatz ab. Es kamen für die Experimente die gleichen Kulturbedingungen und auch das gleiche Medium zur Anwendung, da diese als Standard sowohl für die MC3T3 Zellen und Bakterien gelten. Ebenso wurde der pH-Wert des Mediums von 7,4 während der Kultivierung nicht verändert, damit es zu keiner Anpassung der Zellen an den pH 8,0 kam.

¹¹ Durchgeführt von Dr. Ana Sancho am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde Universität Würzburg

3.5.2. Beschichtung des Glassubstrats mit Titan

Wie bei der Beschichtung mit Siliziumnitrid wurden die Glassubstrate mit Aceton gereinigt und anschließend plasmabehandelt, um für die PVD-Beschichtung eine optimale Haftung des Titans zu gewährleisten (siehe Abschnitt 3.3.2 a). Für die PVD-Beschichtung wurden vier der gereinigten Oberflächen in die in Abschnitt 3.3.2 (c) beschriebene Schattenmaske eingelegt und in die Beschichtungsanlage überführt. Die Abscheidung des Titans erfolgte durch DC-Sputtern bei 400 Watt für 60 s.

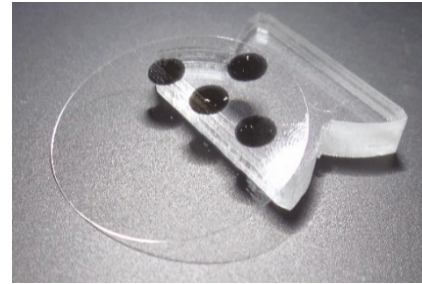


Abbildung 12: Glasdeckgläschen mit vier PVD-beschichteten Titanoberflächen.

3.5.3. Beschichtung der Titanoberflächen mit Kollagen Typ I

Für die Messung wurde jeweils eine Titan-Oberfläche pro Glasdeckglas kurz vorher mit monomerem Kollagen Typ I beschichtet. Nach Herstellerangaben wurde die Kollagen-A-Stammlösung eins zu eins mit Reinstwasser verdünnt und ein 10 μ l-Tropfen der Kollagenlösung auf eine der vier Oberflächen aufgetragen, bevor diese bei 37 °C für 30 min inkubiert wurden.

3.5.4. SCFS auf Kollagen und Titan

Vor Beginn der Messung wurde ein frisch beschichtetes Glasdeckglas mit Hilfe zweier Magneten auf dem Boden einer 35 mm-Zellkulturschale fixiert. Nach Überschichtung mit PBS, das auf einen pH-Wert von 7,4 oder 8,0 eingestellt war, wurde die Zellkulturschale in den „Petri-dish-heater“ eingesetzt und auf 37 °C temperiert. Danach folgte die in den Abschnitten 3.3.4 und 3.3.6 beschriebene Reinigungs- und Funktionalisierungs-Prozedur des Cantilevers sowie die Immobilisierung einer MC3T3-Zelle oder einer Scc-Zelle.

Die am Cantilever immobilisierte Zelle wurde auf eine beschichtete oder unbeschichtete Oberfläche ausgerichtet und jeweils mindestens 20 Kraftabstandskurven aufgenommen. Für die Messungen wurde ein Set-Point von 1 nN gewählt. Die Annäherungs- und Rückzugsgeschwindigkeiten wurden auf 5 μ m/s und eine Kontaktzeit von 5 s eingestellt. Die Auswahl der Oberfläche war willkürlich, um systematische Effekte zu minimieren.

Nachdem auf beiden Oberflächen jeweils ein Satz von Kraft-Abstands-Kurven aufgenommen war, wurde der pH-Wert des Mediums geändert. Dies erfolgte durch Spülen der Petri-Schale mit 12 ml PBS mit einem anderen pH-Wert (7,4 bzw. 8,0). Durch zwei am Rand der Petrischale befestigte Kanülen wurde die neue Lösung auf der einen Seite hinzugefügt und auf der anderen Seite gleichzeitig der Überschuss abgesaugt (Abbildung 13). Im Anschluss wurde erneut auf beiden Oberflächen jeweils ein Satz von Kraft-Abstands-Kurven aufgenommen. Bei einigen Messungen wurde erneut der pH-Wert geändert.

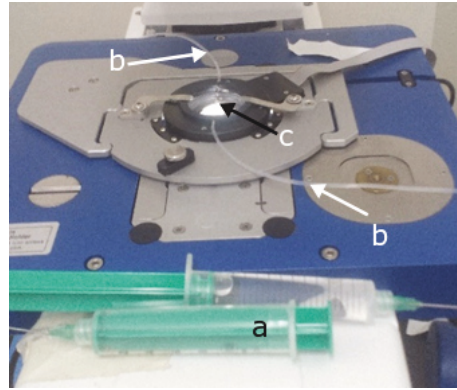


Abbildung 13: Spritzensystem zum Ändern des pH-Werts in der Petrischale. (a) Spritzen durch die das Medium in der (c) Petrischale gewechselt werden kann. Teflonschläuche (b) verbinden die Spritzen mit den Kanülen.

Nach einer kompletten Messung wurde ein Teil des Mediums (ca. 500 μ l) entnommen und der pH-Wert bestimmt.

3.5.5. Zeta-Potential-Messungen an Zellen und Oberflächen

a) Zellen

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.3.1 a beschrieben, abgelöst und in einer Lösung aus 10 mM NaCl und 295 mM Glucose mit ein mit NaOH eingestelltem pH-Wert von 7,4 und 8,0 suspendiert. Es konnte kein PBS eingesetzt werden, da die Leitfähigkeit zu hoch war und es zur Elektrolyse an den Elektroden kam.

Jeweils eine der vier Zellsuspensionen wurde in die Messzelle mittels eines Pumpensystems überführt und das Zeta-Potential aus 14 Messdurchläufen bestimmt. Nach Abschluss der Messung wurde die Messzelle mit zellfreier Lösung gespült und die nächste Zellsuspension in die Messzelle eingeleitet.

b) Oberflächen

Für die Zeta-Potential-Messungen wurden rechteckige Glasträger mit einer Größe von 20 mm x 10 mm mit Titan beschichtet. Nach Reinigung mit Ethanol, Terg-a-Zyme® und Analysenwasser wurde ein Teil der Oberflächen mit Kollagen beschichtet. Die Beschichtung erfolgte wie in Abschnitt 3.5.3 beschrieben. Jeweils eine der beiden Oberflächen wurde in die Spaltmesszelle eingespannt und an das Zeta-Potential-Messgerät angeschlossen. Nach Spülen der Messzelle mit dem Messmedium PBS erfolgte der Start der Messung. Durch die Zugabe von NaOH (50 mM) mittels einer angeschlossenen Titrationseinheit, wurde der pH-Wert von pH 6,3 sukzessiv auf pH 8,6 erhöht. Für beide Oberflächen wurden 10 pH-Stufen mit jeweils 20 Messpunkten aufgenommen.

3.5.6. Herstellung des Implantat-Modellsystems

a) Einsatz von Laserablation zur Herstellung der perforierten Titan-Scheiben¹²

Zur Imitierung einer Implantatoberfläche wurde reines Titan gewählt und an die *in-vitro* - Verhältnisse des Modellsystems angepasst. Hierzu wurden runde Scheiben mit 21 mm Durchmesser aus 150 µm dickem Titanblech herausgeschnitten. Mit diesem Durchmesser sind sie passend für die Wells einer handelsüblichen 12-Well-Platte. Um die Durchlässigkeit der Scheiben zu gewährleisten, wurden im Abstand von 500 µm Löcher mit einem Durchmesser von circa 50 µm eingebracht. Das Heraustrennen der Kreise erfolgte mit einem Ultrakurzpuls- Infrarot-Laser mit 1030 nm Wellenlänge und einer Brennweite von 100 mm bei einer Leistung von 70 %. Mit einer Schneidgeschwindigkeit von 500 mm/s und einer Pulsfrequenz von 66,66 kHz wurden die Kreise in 60 Wiederholungen aus den Titanblechen gelöst. Für das Schneiden der Löcher wurde die Leistung auf 50 % reduziert, aber die Schneidgeschwindigkeit auf 1000 mm/s und die Pulsfrequenz auf 200 kHz erhöht. Mit 500 Wiederholungen wurden die Löcher schrittweise mit in die Platten eingebracht. Das Resultat wurde konfokalmikroskopisch kontrolliert. Vor Verwendung in der Zellkultur wurden die Titanplatten im Ultraschallbad gereinigt und für 300 s bei 75 % Leistung mit Luftplasma behandelt.

b) Herstellung der Polyvinylalkohol (PVA)-Matrix

Die PVA-Matrix, die als schwammähnliches NaOH-Reservoir diente, wurde auf Basis des von Wu et al. [125] etablierten Protokolls für ein neues Polymerelektrolyt hergestellt. Dieses Protokoll konnte nur in einer an die Anforderungen einer biokompatiblen Verbindung angepassten, abgeänderten Form verwendet werden. Daher wurden die potenziell zytotoxischen Effekte hoher Kaliumkonzentrationen durch den Einsatz von Natriumhydroxid (NaOH) anstelle von Kaliumhydroxid vermieden. Für die Herstellung eines Gels wurden 6 g Polyvinylalkohol (PVA), 3 g Titandioxid, 2,39 g NaOH-Pellets in 60 ml destilliertem Wasser gelöst, das für die Befüllung einer 60 cm² Petrischale ausreichend ist.

Unter ständigem Rühren wurden PVA und Titanoxid bei 89 °C in der Natronlauge gelöst und nach 2 min in die Petrischale überführt. Die Bildung des Gels erfolgte durch Inkubation für 48 h bei Raumtemperatur. Nach Abnehmen des Überstandes über dem Gel wurde es 24 Stunden lang bei 40 °C getrocknet. Eine ständige Kontrolle des Trocknungsfortschritts war nötig, da die Gele dazu neigten, bei übermäßigem Wasserentzug zu verspröden.

¹² . Die Laser-Bearbeitung fand durch Herrn Oldorf an der schweißtechnischen Lehr- und Versuchsanstalt (SLV) Rostock statt.

Vor den Experimenten wurden die Gele entweder in 1 M NaOH-Lösung für den Ansatz oder in destilliertem Wasser für die Kontrollen eingeweicht. Zur Vorbereitung der Kontrollen wurde das NaOH aus den Gelen entfernt, indem sie mit 1 l destilliertem Wasser pro Gel bedeckt wurden und anschließend mindestens fünf Tage lang zweimal täglich das Wasser ersetzt wurde.

Für die Beladung der Gele mit Antibiotika wurden die Spüllösungen mit 2 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) versetzt. Das Pen/Strep konnte nicht während der Polymerisierung hinzugefügt werden, da die Gefahr bestand, dass die hohe Temperatur das Pen/Strep zersetzt oder inaktiviert. Vor den Zellkulturexperimenten wurden das beladene NaOH und die Kontrollgele in PBS gespült und über Nacht inkubiert, um überschüssiges NaOH von der Geloberfläche zu entfernen bzw. die Osmolarität auszugleichen.

3.5.7. Einfluss des Implantat-Modellsystems auf *Staphylococcus capitis sub. capitis* (Scc)

Um den Einfluss des alkalisierenden Implantat-Modellsystems auf ein Modellbakterium zu untersuchen, wurde jeweils ein PVA-Gel mit oder ohne Antibiotika-Beladung mit der aufliegenden Titanscheibe in eine 12-Well-Platte gelegt. Zur Kontrolle wurden zwei weitere NaOH-freie Gele mit und ohne Antibiotika mit der Titanscheibe in die Platte gelegt. Alle Oberflächen wurden mit 3 ml Kasein-Soja-Pepton-Brühe überschichtet und darauf folgte das Animpfen mit einer Scc-Übernachtskultur.

Zwei 12-Well-Platten mit der oben beschriebenen Belegung wurden angesetzt und bei 37 °C für 24 h inkubiert. Mit einer der Platten wurde der „LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Assay“ durchgeführt. Hierzu wurden die Titanscheiben aus dem Well entnommen und mit 0,85 % NaCl-Lösung vorsichtig gespült, um nicht adhärente Bakterien zu entfernen, dann in eine neue Well-Platte überführt und mit 1 ml der NaCl-Lösung überschichtet. Nach der Zugabe der beiden DNA-interkalierenden Farbstoffe CYTO 9 (membrangängig) und Propidiumiodid (nicht membrangängig, färbt nur Zellen mit nicht intakter Zellwand) sowie einer Inkubation für 15 min unter Lichtausschluss wurden die Titanscheiben mit doppelseitigem Klebeband auf einem Objektträger fixiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Nach entfernen der Titanscheiben aus der zweiten Platte wurden die Scheiben einzeln in 1 ml isotonische Kochsalzlösung überführt. Nach einer Ultraschallbehandlung wurden 100 µl auf eine Agar-Platte überführt und mit Hilfe eines Drigalskispates gleichmäßig verteilt. Nach einer Inkubation von 24 h erfolgte das Auszählen der Kolonien.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Beeinflussung der Adhäsion von gleichgeladenen Oberflächen in Abhängigkeit vom pH-Wert durch Spermidin

Bereits 1677 beschrieb der Naturforscher van Leeuwenhoek Kristalle in menschlichen Spermatozoen. Diese Kristalle enthielten hohe Konzentration Spermin (3,3 mg/ml), das aus Spermidin synthetisiert wird [126]. Spermidin ist ein Polykation mit drei Stickstoffatomen in einer Kohlenstoffkette (Abbildung 14). In Abhängigkeit vom pH-Wert kann es maximal drei positive Ladungen tragen, die sich an den beiden terminalen primären und der zentralen sekundären Aminogruppe befinden.

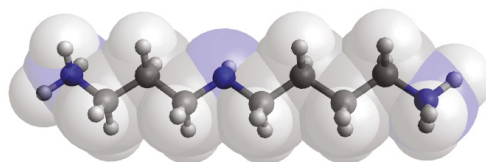


Abbildung 14: Kugel-und-Stab-Darstellung (mit transparent überlagertem Kalottenmodell) eines diprotonierten Spermidinmoleküls mit Kohlenstoff- (schwarz), Wasserstoff- (weiß) und Stickstoff- (blau) Atomen. In mit minimaler Energie Konformation (Vakuum) beträgt der Abstand zwischen den beiden terminalen Aminogruppen ca. 11 Å (berechnet mit Avogadro "an open-source molecular builder and visualization tool", Version 1.1.1).

Aus Untersuchungen an negativ geladenen giant unilamellar vesicles (GUVs), die durch Zugabe von Spermidin spontan fusionieren, ist bekannt, dass Spermidin die Abstoßung von gleichgeladenen negativen Oberflächen herabsetzt oder aufhebt. Dieser Effekt ist im Hinblick auf die Beeinflussung des Einwachsverhaltens medizinischer Implantate von großem Interesse, da Spermidin die elektrostatische Repulsion der meist negativ geladenen Implantat-Oberflächen minimieren könnte. Kraftspektroskopie kann hier umfangreich charakterisieren, wie der Grad der Spermidinprotonierung auf die Adhäsionskräfte zwischen negativ geladenen Oberflächen wirkt.

Die Messungen wurden von Herrn Dr. Thomas Weihe (ehemaliger Doktorand am Lehrstuhl für Biophysik, Universität Rostock) durchgeführt aber nur teilweise ausgewertet. Auf eine detaillierte Beschreibung der Methode wurde hier verzichtet, da sich mein Beitrag auf zusätzliche Messungen, die Datenauswertung und die Interpretation der kraftspektroskopischen Messungen beschränkt. Für eine detaillierte Beschreibung sei auf Gimsa, Wysotzki et al. verwiesen [119].

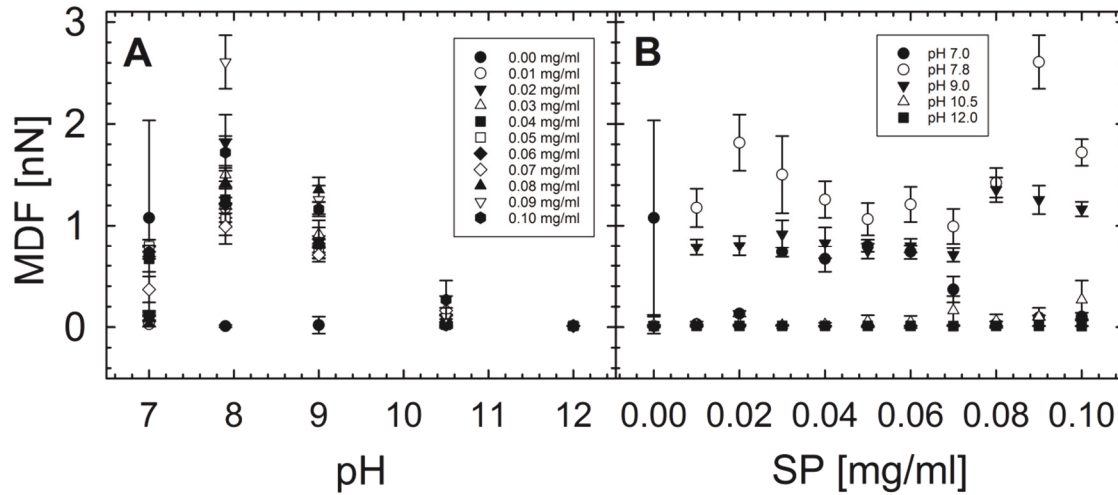
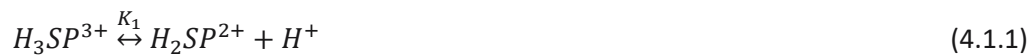


Abbildung 15: Abhängigkeit der MDF von pH-Wert (A) und Spermidinkonzentration (B). Die MDF-Normalisierung auf den Kugeldurchmesser konnte vermieden werden, indem sphärische Borosilikatpartikel mit etwa identischen Durchmessern für pH 7,9 (10 µm), pH 9 (10,2 µm) und pH 10,5 (9,9 µm) ausgewählt worden sind. Abbildung publiziert in Gimsa, Wysotzki et al. [119].

Die Abbildung 15 fasst die Ergebnisse der Messung zusammen. Es ist ein Abfall der MDFs mit steigendem pH-Wert zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass die triprotonierten Spermidinarten die höchsten Beiträge zur MDF leisten. Für diprotonierte, monoprotionierte und nichtprotonierte Spermidin-Spezies sinkt der Beitrag sukzessiv. Daher ist es möglich, die durch Spermidin induzierten Kräfte mit dem Grad der Portionierung zu korrelieren.

Die pH-abhängige Wahrscheinlichkeit der Protonierung der drei N-Gruppen hängt von ihrer Position im Spermidinmolekül ab. Diese Wahrscheinlichkeit wird durch die pK_a -Werte von 8,25, 9,71 und 10,90 beschrieben [127]. In dem pH-Bereich der Experimente ändert sich die Protonierung des Spermidins von einfach auf zweifach positiv bei etwa pH 10,5 und von zweifach auf dreifach positiv bei etwa pH 8,5.

Aus dem Massenwirkungsgesetz folgt, dass die Protonierung von Spermidin durch drei Gleichgewichtsreaktionen beschrieben werden kann. Aus diesen gehen die drei Gleichgewichtskonstanten K_1 , K_2 und K_3 hervor:



Diese drei Gleichgewichtskonstanten sind von Kimberly und Goldstein aus den chemischen Verschiebungen in ^{13}C -NMR-Experimenten bestimmt worden [127].

Die gesamte Spermidinkonzentration [SP] ergibt sich aus der Summe der nicht protonierten [SP⁰] sowie der mono- [HSP⁺], di- [H₂SP²⁺] und triprotonierten [H₃SP³⁺] Spermidinspezies:

$$[SP] = [SP^0] + [H_2SP^+] + [H_2SP^{2+}] + [H_3SP^{3+}] \quad (4.1.4)$$

Korreliert man die Konzentration der verschiedenen Spermidinspezies mit der erzeugten MDF, so ergibt sich für die MDF:

$$MDF = f_0 [SP^0] + f_1 [HSP^+] + f_2 [H_2SP^{2+}] + f_3 [H_3SP^{3+}] \quad (4.1.5),$$

wobei die spezifischen MDF-Beiträge jeder Spezies durch die Konstanten f_0 , f_1 , f_2 , und f_3 gewichtet sind. Da die schwachen Kraftbeiträge der nichtprotonierten und monoprotonierten Spermidinarten vernachlässigbar sind, wurde die Gleichung um diese freien Parameter reduziert ($f_0 = f_1 = 0$).

Aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich damit für die Konzentrationen der di- [H₂SP²⁺] und triprotonierten [H₃SP³⁺] Spermidinarten folgende Gleichung:

$$[H_3SP^{3+}] = \frac{[H^+]^3 [SP]}{[H^+]^3 + [H^+]^2 K_1 + [H^+] K_1 K_2 + K_1 K_2 K_3} \quad (4.1.6)$$

$$[H_2SP^{2+}] = \frac{k_1 [H^+]^2 [SP]}{[H^+]^3 + [H^+]^2 k_1 + [H^+] k_1 k_2 + k_1 k_2 k_3} \quad (4.1.7)$$

Durch das Einsetzen der Gleichungen (4.1.6) und (4.1.7) in die Gleichung (4.1.5) gilt für die pH-abhängige MDF folgende sigmoidale Funktion:

$$MDF = \frac{[H^+]^2 [SP] ([H^+] f_3 + f_2 k_1)}{[H^+]^3 + [H^+]^2 k_1 + [H^+] k_1 k_2 + k_1 k_2 k_3} \quad (4.1.8)$$

Durch ein nicht-lineares Regressionsverfahren wurde die Funktion (4.1.8) für jede Konzentration einzeln an die Messdaten (Abbildung 15) angepasst (Abbildung 16).

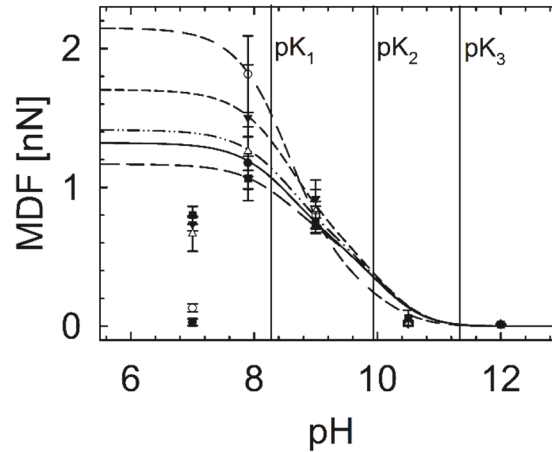


Abbildung 16: Spermidin-induzierte MDF in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Kurven sind eine Anpassung von Gleichung 4.1.8 ($R^2=0,95$) an die Daten in Abbildung 15 (0,01 mg/ml (gefüllte Kreise / durchgezogene Linie), 0,02 mg/ml (offene Kreise / mittellang gestrichelte Linie), 0,03 mg/ml (gefüllte Dreiecke nach unten / kurz gestrichelte Linie), 0,04 mg/ml (offene Dreiecke / strichpunktierte Linie) und 0,05 mg/ml (gefüllte Quadrate / lang gestrichelte Linie)). Die Messpunkte bei pH 7,0 wurden von der Anpassung ausgeschlossen. Abbildung publiziert in Gimsa, Wysotzki et al. [119].

Die Höhe der Plateaus der pH-abhängigen Kurven wird durch f_3 definiert, d.h. durch den maximalen Beitrag des triprotonierten Spermidins. Der auffälligste Unterschied zu Abbildung 15 ist die inkonsistente Plateauhöhe bei unterschiedlichen Spermidinkonzentrationen. Diese Plateau-Änderungen, wie man aus Abbildung 17 erkennen kann, folgen keinem offensichtlichen Trend in den unterschiedlichen Plateauhöhen in Abhängigkeit von den Spermidinkonzentrationen. Neben den starken Schwankungen der Plateauhöhe ist auch eine Veränderung der Position der Wendepunkte bei pK_1 zu beobachten.

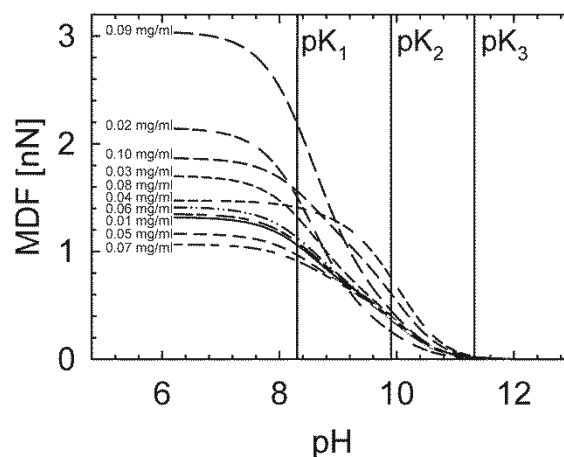


Abbildung 17: Sigmoidale Anpassung der MDFs aller Spermidinkonzentrationen. Die Messpunkte bei pH 7 wurden von der Anpassung ausgeschlossen. Abbildung publiziert in Gimsa, Wysotzki et al. (2018). [119]

Die Abbildung 18 zeigt die Auftragung der Kraftkoeffizienten f_2 und f_3 in Abhängigkeit von der Spermidinkonzentration, die sich aus der nicht-linearen Anpassung aller Spermidinkonzentrationen ergaben. Es ist klar eine Abhängigkeit dieser beiden Faktoren zu erkennen.

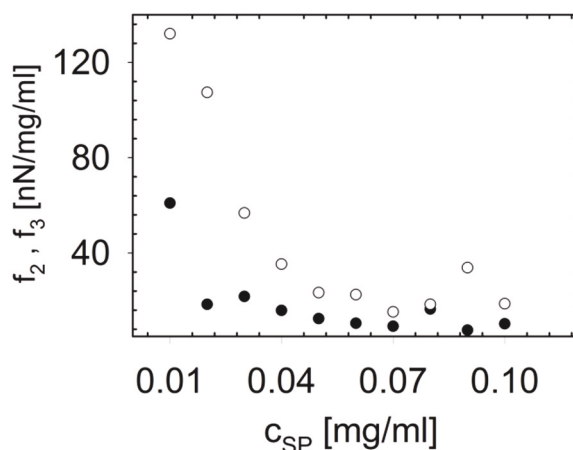


Abbildung 18: Berechnete Kraftkoeffizienten von f_2 und f_3 der diprotonierten (offene Kreise) und triprotonierten (gefüllte Kreise) Spermidinarten bei unterschiedlichen Spermidinkonzentrationen (siehe Gleichung 4.1.8). Abbildung publiziert in Gimsa, Wysotzki et al. [119].

Die abnehmenden Kraftbeiträge zu höheren Spermidinkonzentrationen deuten darauf hin, dass die Oberflächen oberhalb von 0,05 mg/ml gesättigt sind und daher keine Konzentrationsabhängigkeit f_2 und f_3 erkennbar war (Abbildung 18).

Die Ergebnisse zeigen, dass Spermidin eine elektrostatische Anziehungskraft zwischen dem negativ geladenen Borosilikat und den Glimmer-Oberflächen erzeugen kann. Eine Möglichkeit, diesen Befund zu erklären, ist die Anwendung der DLVO-Theorie. Sie beschreibt die gesamte Wechselwirkungsenergie zwischen Objekten oder Oberflächen durch überlagerte Exponentialfunktionen mit spezifischen Abstandsabhängigkeiten [128]. In der Theorie kann die elektrostatische Abstoßung zwischen zwei gleich geladenen Oberflächen durch die attraktiven van der Waals-Kräfte überwunden werden. Dies gilt auch für kleine Gegenionen, die auf kurze Distanz elektrostatische Anziehung induzieren [129]. Auf Grund der polykationischen Eigenschaften des Spermidins kann davon ausgegangen werden, dass stärkere van der Waals-Attraktionen induziert werden als für kleinere anorganische Ionen.

Die von Frau Sarka Perutkova (University of Ljubljana, Slovenien) für die Publikation durchgeführten Monte-Carlo-Simulationen zeigten, dass ein bestimmter Prozentsatz der als stabförmig angenommenen Spermidinmoleküle in senkrechter Ausrichtung an die Oberflächen gebunden sind [119]. Dies vermittelt bei geringen Abständen der negativ geladenen Oberflächen einen sogenannten „bridging force mechanism“ (Brückenbindungseffekt) [130–132]. Dies ist eine weitere Erklärung für die adhäsionsinduzierende Wirkung des Spermidins. Auch wurde aus den Simulationen ersichtlich, dass die Effektivität bei zunehmenden Oberflächenladungen erhöht ist, da dies die Anzahl der senkrecht ausgerichteten Moleküle zunimmt [119]. Dennoch waren eine große Anzahl an Molekülen auf der Oberfläche parallel angeordnet, was eine Verringerung der

effektiven Oberflächenladungsdichten und die elektrostatische Abstoßung bei großen Oberflächenabständen reduziert [133]. In den publizierten Experimenten wurde eine Abstoßung oberhalb von 0,02 mg/ml Spermidin bei pH 9,0 nachgewiesen, obwohl die Moleküle überwiegend diprotoniert waren (Abbildung 3D in [119]). Dies kann dadurch erklärt werden, dass die effektive Oberflächenladung durch die an der Oberfläche parallel gebundenen Moleküle abgeschirmt wurde. Darüber hinaus entsteht durch diese Anordnung eine Energiebarriere, die durch die Abstoßung der positiv geladenen Kopfgruppen der senkrecht ausgerichteten Spermidinmoleküle erzeugt wird [119]. Erst wenn diese Barriere überwunden wird, kann der „bridging force mechanism“ wirken.

4.2. Einfluss von PEI, PEI-Laminin und PDL-Laminin Oberflächenbeschichtungen auf die Initialadhäsion von Zellen auf Siliziumnitrit

SCFS ist eine Standardmethode zur Untersuchung von Zell-Oberflächen-Interaktionen auf Einzelzelebene [29,134]. Auch wenn SCFS ein elegantes Verfahren ist, sind SCFS-Messungen bei der Suche nach Oberflächenbeschichtungen für biomedizinische Anwendungen noch kein Standard [97]. Im Allgemeinen ist die Standardabweichung der SCFS-Ergebnisse aufgrund der biologischen Variabilität einzelner Zellen in Bezug auf die zu untersuchende Eigenschaft hoch [135]. Dieses Problem macht es umso wichtiger, mit derselben Einzelzelle viele verschiedene Oberflächen zu untersuchen. Hierzu wurden einzelne Zellen verschiedener Zelltypen mit Hilfe von Polydopamin immobilisiert und Kraft-Abstands-Kurven auf Siliziumnitrid, PEI, PEI/Laminin und PDL/Laminin aufgenommen und aus diesen die MDFs ermittelt. Das keramische Siliziumnitrid wird häufig als Isolationsschicht in Halbleitern und auf leitfähigen Leiterbahnen von Multi-Elektroden-Arrays [136] eingesetzt, wie auch in Lab-on-Chip-Systemen [137]. Daher ist dieses Material von Interesse für die Entwicklung von elektrischen Schnittstellen wie auch von Sensorik in biologischen Systemen.

Wie auch das Siliziumnitrid sind PEI- und PDL-Polymere positiv geladen (bei pH 7,4), was den Kontakt mit den negativ geladenen Zelloberflächen elektrostatisch begünstigt. Für PEI-Beschichtungen wurde von einer Reihe von Autoren berichtet, dass die Zelladhäsion für Zelltypen wie PC12, HEK-283 und menschlichen osteoblastenartige Zellen gefördert wird [104,138]. In den neuronalen Zellkulturen werden PEI-Beschichtungen wie auch PDL, oft als zelladhäsionsverbessernden Beschichtung eingesetzt [139,140]. Dabei kommt Laminin häufig als zusätzliche Beschichtung zum Einsatz, da neuronale Zellen spezifische Laminin-bindende Moleküle tragen [141,142]. Neben der Zelladhäsion spielt das Lamininprotein eine Rolle bei der Zellproliferation. In Geweben bindet Laminin an ECM-Komponenten wie Kollagen oder Nidogen [143]. In der Basalmembran bildet es netzartige Strukturen, die Zugkräften widerstehen.

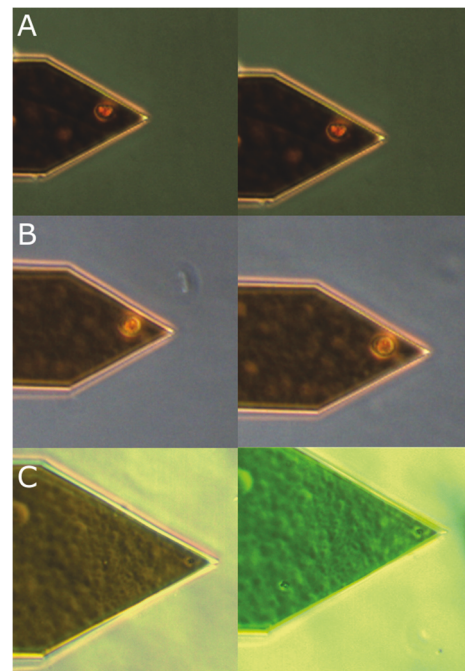


Abbildung 19: Repräsentative mikroskopische Bilder der drei Zelltypen PNZs (A), MC3T3 (B) und Scc-Zellen, die am Cantilever befestigt sind, vor (links) und nach (rechts) einem kompletten Messzyklus.

Die drei eingesetzten Zellarten sind grundverschieden, dadurch decken sie ein großes Spektrum ab, da es sich um primäre neuronale Mauszellen (PNZ), eine osteoblastenartige Zelllinie (MC3T3) und *Staphylococcus capitis sub. capitis* (Scc) Bakterienstamm handelt.

Die Abbildung 20a fasst die MDF-Ergebnisse für die Referenzoberfläche aus reine, unbeschichtetem Siliziumnitrid zusammen. Von den drei Zelltypen zeigten PNZ die niedrigsten MDFs auf allen Oberflächen, mit Ausnahme von MC3T3-Zellen auf Siliziumnitrid für 1 s Kontaktzeit (Abbildung 20a). Wie erwartet, stiegen die MDFs für längere Kontaktzeiten generell an, mit Ausnahme der MC3T3-Zellen, die jedoch bereits von 1 bis 2 s einen steilen Anstieg der MDFs aufwiesen (Abbildung 20a, hellgraue Balken).

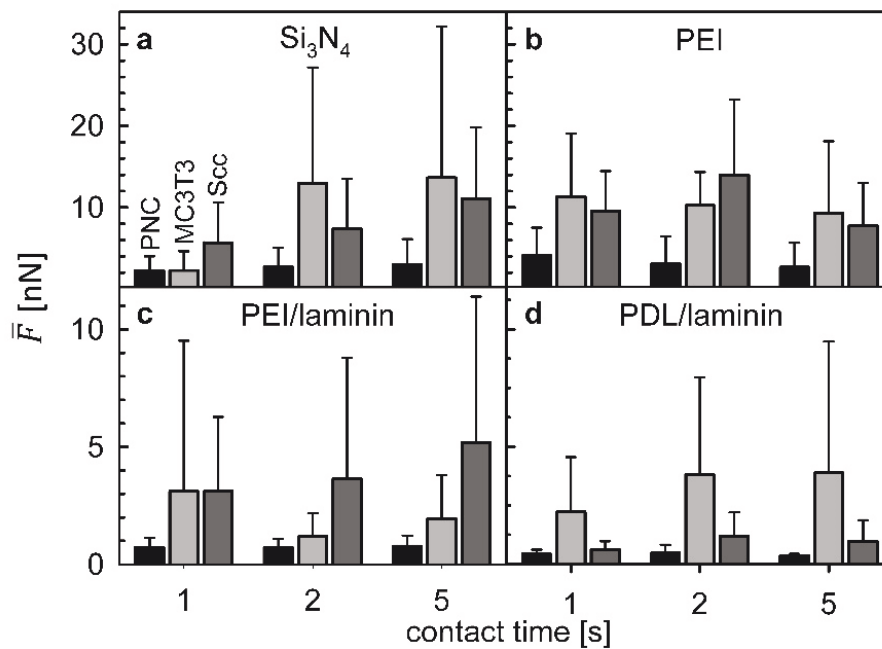


Abbildung 20: Mittlere Mess-MDFs ($\bar{F}_{n,s,t}$) der drei Zelltypen, PNZ (schwarz, n=12), MC3T3 (hellgrau, n=14) und Scc (dunkelgrau, n=10) auf der Siliziumnitrid-Referenzfläche für Kontaktzeiten von 1, 2 und 5 s (a). MDFs ($\bar{F}_{n,s,t}$) auf PEI-, PEI/Laminin- und PDL/Laminin-Oberflächen für die gleichen Zellen (PNZ, n=10; MC3T3, n=9; Scc, n=9) werden in b, c und d dargestellt. Die statistischen Unterschiede im charakteristischen MDF-Verhalten der Zelltypen wurden durch eine Zweiweg-Varianzanalyse analysiert (Tabelle 3 – Seite 51). Abbildung publiziert in Wysotzki et al. (2019).

Für eine Kontaktzeit von einer Sekunde waren die MDFs auf den PEI-beschichteten Oberflächen bei allen Zelltypen gegenüber der Siliziumnitridoberfläche signifikant erhöht. Abgesehen von den absoluten MDFs war der zeitliche Anstieg bei allen anderen Beschichtungen schneller als bei Siliziumnitrid. Hierbei sollte angemerkt werden, dass die MDFs der Scc auf PEI zwischen 1 und 2 s Kontaktzeit erhöht wurden, aber bei 5 s sank die durchschnittliche MDF unter den Wert bei 2 s Kontaktzeit (Abbildung 20 b, dunkelgraue Balken). Durch den Zusatz von Laminin wurden die MDFs für alle Zelltypen im Vergleich zu Siliziumnitrid und PEI reduziert. Um die Wirkung der beiden Basisbeschichtungen auf die Lamininoberfläche zu charakterisieren, wurde PEI/Laminin mit

PDL/Laminin verglichen. Die Mess-MDFs auf den PEI/Laminin-Oberflächen waren mehr als doppelt so hoch wie auf PDL/Laminin für PNZ und Scc-Zellen, während sich diese Beziehung für die MC3T3-Zellen für Kontaktzeiten von 2 und 5 s nahezu umkehrte.

Da sich die MDFs auf den beiden Lamininbeschichtungen unterschieden, wurden mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie die Laminindichten auf PEI- und PDL-Basisbeschichtungen verglichen. Um das an der Oberfläche gebundene Laminin nachzuweisen, wurde dies durch einen primären Kaninchenantikörper gebunden. Das Fluoreszenzsignal wurde durch die Bindung eines Fluorophor markierten sekundären Antikörpers an den Laminin-Antikörper erzeugt.

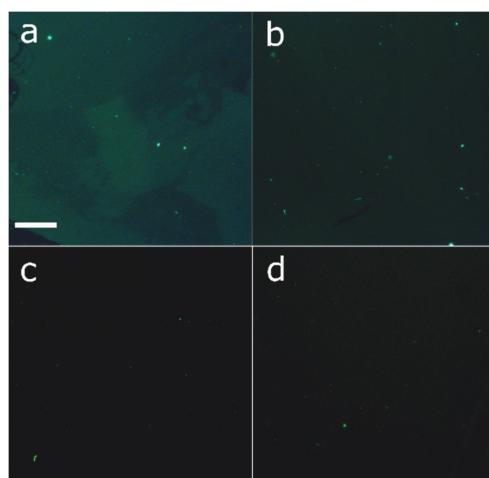


Abbildung 21: Fluoreszenzbilder der PEI/Laminin (a) und PDL/Laminin (b) Oberflächen, die mit fluoreszenzmarkierten Laminin-Antikörpern immungefärbt wurden. Um die Autofluoreszenz der lamininfreien Beschichtungen zu kompensieren, wurden auch PEI (c) und PDL (d) Oberflächen untersucht. Weißer Maßbalken: 50 µm. Abbildung publiziert in Wysotzki et al. [144].

Neben den Laminin-beschichteten Oberflächen wurde die Fluoreszenzintensität von PEI und PDL bestimmt und diese von der Laminin-Fluoreszenzintensität abgezogen, um eine mögliche Auto-Fluoreszenz zu kompensieren. Die aus „imageJ“¹³ ermittelten Werte sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Für die PEI-Oberfläche ergab sich im Mittel eine etwa doppelt so hohe detektierte Fluoreszenzintensität wie für die PDL-Oberfläche (Tabelle 2), was der doppelten Konzentration an oberflächengebundenem Laminin entspricht.

¹³NIH ImageJ V. 1.8.0, <https://imagej.nih.gov/ij/>

Tabelle 2: Die Intensität des Grünkanals (8-bit, 0-255) wurde mit der Bildanalysesoftware imageJ¹³ auf ca. 0,64 mm² gemittelt. Pro Beschichtung wurden vier Bilder analysiert.

	Intensität des Grünkanals	Standardabweichung
PEI (background)	3,4	±0,03
PDL (background)	2,1	±0,08
PEI/Laminin	22,2	±2,71
PDL/Laminin	11,4	±1,10

4.2.1. Normierung der Ergebnisse

Um die Vergleichbarkeit der MDFs auf den verschiedenen Oberflächen zu verbessern, kann die MDF einer einzelnen Zelle (n), gemessen auf drei verschiedenen beschichteten Oberflächen ($s=1..3$, 1: PEI, 2: PEI/Laminin, 3: PDL/Laminin), auf die unbeschichtete Referenzoberfläche ($s=0$, Siliziumnitrid) normiert werden. In diesem Fall können verschiedene Normalisierungsmöglichkeiten in Betracht gezogen werden, die jeweils andere Unterschiede aufzeigen. Um den Einfluss der Kontaktzeit auf die MDF für die drei Zellarten zu berücksichtigen, wurde die MDF jeder Zelle ($F_{n,s,t}$) durch die entsprechende Referenz ($F_{n,0,5}$) geteilt, die der MDF auf der Referenzoberfläche für eine Kontaktzeit von 5 s entsprach.

Dies ergibt einen dimensionslosen relativen Parameter mit reduzierten Auswirkungen auf die einzelnen Zelleigenschaften, wie z.B. die Zellgröße:

$$\Phi_{n,s,t}^{5sec} = \frac{F_{n,s,t}}{F_{n,0,5}} \quad (4.2.1.1)$$

Die Mittelwertbildung liefert die mittlere relative MDF für den zu untersuchenden Zelltyp:

$$\bar{\Phi}_{s,t}^{5sec} = \frac{1}{n} \sum_{n=1..n} \Phi_{n,s,t}^{5sec} \quad (4.2.1.2)$$

Dennoch gleicht dieser Parameter grundlegende Unterschiede in den MDF-Stärken der verschiedenen Zellarten aus. Um dieses Merkmal wiederherzustellen und die Auswirkungen der verschiedenen Beschichtungen auf die MDFs der verschiedenen Zelltypen hervorzuheben, wurde $\bar{\Phi}_{s,t}^{5sec}$ in die spezifische MDF $F_{n,s,t}^{spec}$ der Zellen der betrachteten Art umgewandelt. Dies wurde erreicht, indem die $\bar{\Phi}_{s,t}^{5sec}$ jeder Zelle mit $F_{n,0,5}$ multipliziert wurde, dem mittleren MDF auf der Referenzoberfläche für einen 5 s-Kontakt:

$$F_{n,s,t}^{spec} = \Phi_{n,s,t}^{5sec} \bar{F}_{0,5} = \Phi_{n,s,t}^{5sec} \frac{1}{n} \sum_{n=1..n} F_{n,0,5} \quad (4.2.1.3)$$

Die Mittelung über alle Zellen ergibt das spezifische mittlere MDF für jede Oberfläche und Kontaktzeit:

$$\bar{F}_{s,t}^{spec} = \frac{1}{n} \sum_{n=1..n} F_{n,s,t}^{spec} \quad (4.2.1.4)$$

Eine weitere Normalisierungsmethode betont den Einfluss einer bestimmten Beschichtung auf die Interaktion mit einem bestimmten Zelltyp. Der relative Parameter $\Phi_{n,s,t}^{5sec}$ wurde für $s = 1, 2$ und 3 und für $t = 1, 2$ und 5 s erhalten, indem die MDFs ($F_{n,s,t}$) jeder Kontaktzeit einer Zelle n durch die MDFs ($F_{n,0,t}$) der jeweilige Kontaktzeit auf Siliziumnitrid geteilt wurden.

Eine weitere Möglichkeit ist die Normierung auf Siliziumnitrid separat für jede Kontaktzeit. Hierbei ergibt sich bei Mittelung über n Zelle:

$$\bar{\Phi}_{s,t}^{\tau} = \frac{1}{n} \sum_{n=1..n} \Phi_{n,s,t}^{\tau} = \frac{1}{n} \sum_{n=1..n} \frac{F_{n,s,t}}{F_{n,0,t}} \quad (4.2.1.5)$$

Dieser dimensionslose Parameter wurde durch das hochgestellte τ gekennzeichnet. Um dimensionale, kontaktzeitspezifische MDFs für einen bestimmten Zelltyp zu erhalten, wurde die relative MDF ($\bar{\Phi}_{s,t}^{\tau}$) für die betrachtete Kontaktzeit mit dem mittleren MDF auf der Referenzfläche multipliziert. Die Mittelung über n Zellen ergibt:

$$\bar{F}_{s,t}^{\tau spec} = \frac{1}{n} \sum_{n=1..n} (\Phi_{n,s,t}^{\tau} \bar{F}_{0,t}) = \frac{1}{n} \sum_{n=1..n} (\Phi_{n,s,t}^{\tau} \frac{1}{n} \sum_{n=1..n} \bar{F}_{n,0,t}) \quad (4.2.1.6)$$

4.2.2. Normierung auf Siliziumnitrid je gemessene Kontaktzeit

Abbildung 22 stellt die spezifischen MDFs ($\bar{F}_{s,t}^{\tau spec}$) dar, die sich aus der alternativen Normalisierungsmethode ergeben. Für die spezifischen MDFs wurde die relative MDF jeder einzelnen Zelle mit der mittleren MDF auf der Referenzoberfläche für die jeweilige Kontaktzeit multipliziert (siehe Gleichung 4.2.1.6).

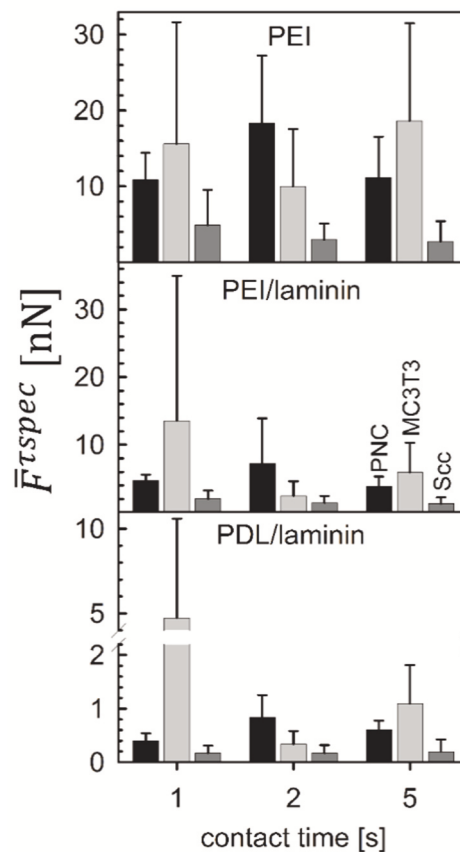


Abbildung 22: Spezifische MDFs (\bar{F}_{st}^{spec}) von PNZ (schwarz), MC3T3 (hellgrau) und Scc (dunkelgrau) auf PEI-, PEI/Laminin- und PDL/Laminin-Oberflächen. Abbildung publiziert in Wysotzki et al. [144].

Von dieser Form der Normierung wurde Abstand genommen, da sich die Interpretation als komplex erwies. Die Streuung bei 1 s-Kontaktzeit auf der Referenzoberfläche war relativ hoch und nahm zu längeren Kontaktzeiten ab. Daher konnte nur sehr eingeschränkt unterschieden werden, ob es sich um einen Effekt der Oberfläche oder ein Artefakt der Normierung handelte. Ein Vergleich der Kontaktzeit war ebenfalls sehr kritisch, da jede Kontaktzeit jeder Zelle auf einem anderen Normierungswert basierte.

4.2.3. Normierung auf Siliziumnitrid bei 5 s-Kontaktzeit

Durch die Bildung der relativen MDF ($\bar{\Phi}_{st}^{5sec}$) verschwanden die grundlegenden MDF-Differenzen zwischen den Zelltypen (Abbildung 24). Die Daten zeigen, dass die drei Beschichtungen unterschiedliche relative MDFs induzieren. Interessanterweise sind diese Unterschiede für jeden Zelltyp ähnlich, was auf die gleichen qualitativen Interaktions- und Adhäsionsmechanismen für alle Zelltypen hindeutet.

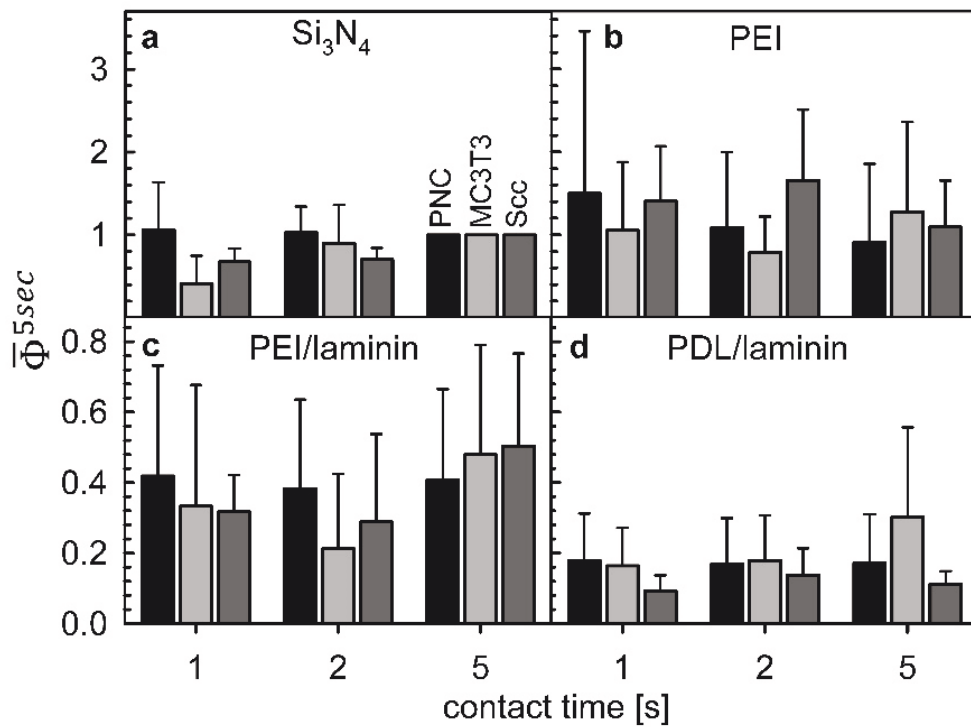


Abbildung 23: Mittlere relative MDFs ($\bar{\Phi}_{n,s,t}^{5sec}$) von PNZ (schwarz), MC3T3-Zellen (hellgrau) und Scc-Zellen (dunkelgrau) auf (a) Siliziumnitrid (Si_3N_4), (b) PEI-, (c) PEI/Laminin- und (d) PDL/Laminin-Oberflächen. Für die 5 s-MDFs auf Siliziumnitrid, das als Referenz dient, wurden Einheitsäulen ohne Streuung erhalten. Abbildung publiziert in Wysotzki et al. [144].

Die MDF jeder Zelle für die unterschiedlich beschichteten Oberflächen ($F_{n,s,t}$) wurde durch $F_{n,0,5}$ geteilt, das entspricht der MDF auf der Referenzoberfläche für 5 s Kontaktzeit (Gleichung 4.2.1.2). Die erhaltenen relativen MDF-Werte waren für alle Zelltypen auf einer gegebenen Beschichtung vergleichbar (Abbildung 23). Im Durchschnitt wurde die Standardabweichung der relativen MDFs um 22 % gegenüber der Standardabweichung der Mess-MDFs reduziert. Offensichtlich waren die relativen MDFs auf der beschichteten Oberfläche am höchsten für PEI, signifikant niedriger bei PEI/Laminin und am niedrigsten für PDL/Laminin, was weitgehend mit den Mess-MDFs übereinstimmt (vgl. Abbildung 20 mit Abbildung 22).

Um zelltypspezifische MDFs für die verschiedenen Beschichtungen wieder darzustellen, wurden die relativen MDFs jeder einzelnen Zelle mit dem Mittelwert der Mess-MDF ihres Zelltyps für die Kontaktzeit von 5 s auf der Referenzoberfläche multipliziert (Gleichung 4.2.1.3). Die spezifischen MDFs (Gleichung 4) erhalten im Allgemeinen die reduzierte Streuung der relativen MDFs aufrecht (Abbildung 24).

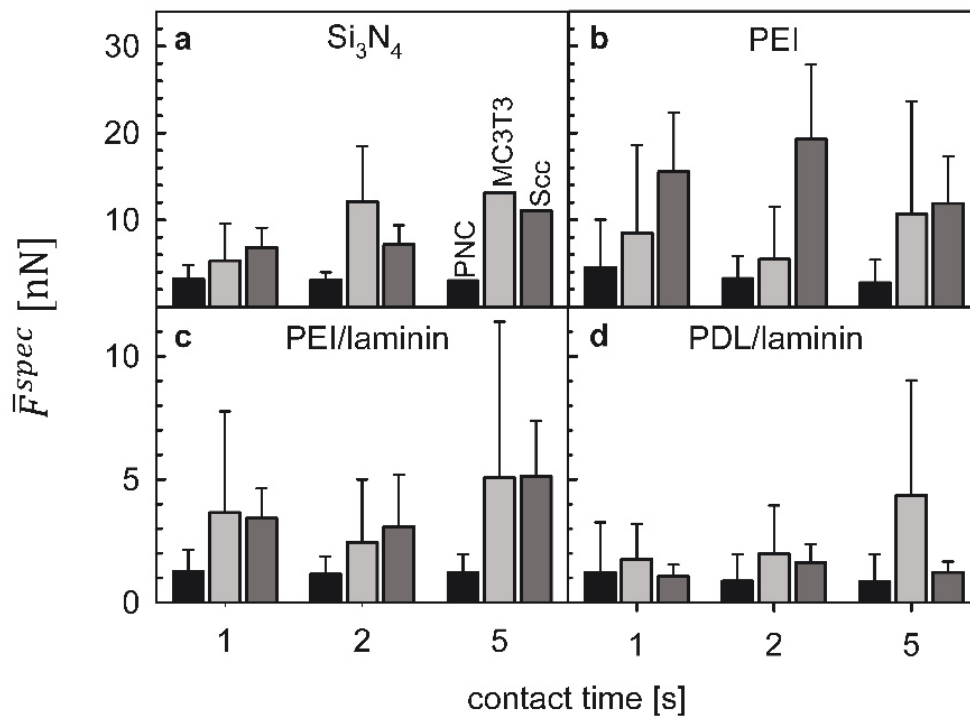


Abbildung 24: Mittlere spezifische MDF ($\bar{F}_{s,t}^{spec}$) (Gleichung 4.2.1.4) von PNZ (schwarz), MC3T3 (hellgrau) und Scc (dunkelgrau) auf (a) Siliziumnitrid (Si_3N_4)-, (b) PEI-, (c) PEI/Laminin- und (d) PDL/Laminin-Oberflächen. Die statistischen Unterschiede im charakteristischen MDF-Verhalten der Zelltypen wurden durch Zweifach-Varianzanalysen analysiert (Tabelle 3). Abbildung publiziert in Wysotzki et al. [144].

Obwohl es deutliche Unterschiede zwischen den Mess-MDFs und den spezifischen MDFs gibt, liegen beide eindeutig im gleichen Kraftbereich (vgl. Abbildung 20 mit Abbildung 24). Auch wurden die allgemeinen MDF-Differenzen für die verschiedenen Beschichtungen beibehalten (vgl. Abbildung 20 mit Abbildung 24).

Ein ausgeprägter Unterschied zwischen den Zelltypen wurde auf PEI bei den Kontaktzeiten von 1 und 2 s sichtbar. Die spezifischen MDFs auf den PEI/Laminin- und PDL/Laminin-Beschichtungen sind bei PNZ im Vergleich zu den Mess-MDFs im Allgemeinen erhöht. Die Unterschiede aufgrund der unterschiedlichen Kontaktzeiten innerhalb der Mess-MDFs bzw. innerhalb der spezifischen MDFs änderten sich im Vergleich nur geringfügig. Auf der PEI/Laminin-Beschichtung zeigten sowohl MC3T3- als auch Scc-Zellen jeweils nahezu die gleichen spezifischen MDFs für die verschiedenen Kontaktzeiten.

Die Anzahl der statistisch signifikanten Unterschiede ($p \leq 0,05$) stieg in den durchgeführten Zweifach-Varianzanalysen (Tabelle 3) von 11 (Mess-MDFs) auf 13 (spezifische MDFs).

Tabelle 3: Ergebnis der zweiseitigen ANOVA-Analyse von Mess-MDFs ($\bar{F}_{n,s,t}$) und spezifischen MDFs ($\bar{F}_{s,t}^{spec}$) für jeden Zelltyp unter Berücksichtigung der drei Kontaktzeiten. Signifikanzstufen sind für $p \geq 0.05$ (keine), $p \leq 0.05$ (*) und $p \leq 0.01$ (***) markiert und durch einen Schrägstrich getrennt $\bar{F}_{n,s,t} / \bar{F}_{s,t}^{spec}$.

Statistische Unterschiede	PNZ	MC3T3	ScC
Siliziumnitrid vs. PEI	-/-	-/-	-/***
Siliziumnitrid vs. PEI/Laminin	***/***	*/*	*/***
Siliziumnitrid vs. PDL/Laminin	***/***	*/***	***/***
PEI vs. PEI/Laminin	***/***	*/***	***/***
PEI vs. PDL/Laminin	***/***	*/***	***/***
PEI/Laminin vs. PDL/Laminin	-	-	-/***

Während die Einführung der spezifischen MDFs die statistische Signifikanz der PNZ-Ergebnisse nicht verbesserte, konnte es die Signifikanz sowohl für MC3T3- als auch für ScC-Zellen verbessern. Es ist hervorzuheben, dass statistisch signifikante Unterschiede zwischen PEI/Laminin und PDL/Laminin nur für die ScC-Zellen bestanden und dass keine statistisch signifikanten Unterschiede für die spezifischen MDFs von MC3T3-Zellen und PNZ gefunden wurden (Tabelle 3). Im Vergleich des MDF-Verhaltens der drei Zelltypen zeigten die PNZ ein statistisch signifikantes anderes Verhalten als die MC3T3- und ScC-Zellen, die sich zueinander ähnlicher verhielten.

Die reinen, unbeschichteten Siliziumnitridoberflächen dienten in den Experimenten als Referenz, da diese Oberflächen durch das eingesetzte PVD-Verfahren glatt, homogen und reproduzierbar waren. Deshalb führt diese Oberfläche nur sehr wenige zusätzliche Parameter für die Normalisierung ein. Relative MDFs trugen dazu bei, das Problem der Streuung einzelner Zelleigenschaften zu minimieren. Dabei wurde die MDF jeder Zelle für die unterschiedlich beschichteten Oberflächen durch die MDF der 5 s-Kontaktzeit auf der Referenzfläche geteilt. Als weitere Möglichkeit die gemessenen MDFs zu normieren, wurde die MDF jeder Zelle für jede Kontaktzeit auf einer bestimmten Beschichtung auf die gleiche Kontaktzeit auf der Referenzoberfläche normiert. Während diese Normalisierungsmethode Informationen über die durch die verschiedenen Beschichtungen verursachten MDF-Differenzen liefern kann, behält das hier bevorzugte Verfahren auch die Kontaktzeitabhängigkeiten bei. Es wird davon ausgegangen, dass sich die 5 s-MDF auf der Referenzoberfläche einem „Plateau-MDF“ angenähert hat. In der Regel reduzierten beide Methoden die Standardabweichungen und erhöhten die statistische Signifikanz.

Die erhaltenen gemittelten spezifischen MDFs (Gleichung 4.2.1.4) zeigen erneut die Zelltypspezifität der Mess-MDFs (Abbildung 4.2.1.5). Im Gegensatz zu den Mess-MDFs haben spezifische MDFs den Vorteil, dass spezifische Eigenschaften der einzelnen Zellen, die die Messungen beeinflussen, wie Zellgröße, Kontaktfläche, Dichte der Ladungen oder Molekülgruppen die den Kontakt vermitteln, vollständig kompensiert oder in ihrer Wirkung reduziert werden, was sich in den reduzierten Standardabweichungen zeigt. Es gibt andere Ansätze zur Minimierung des Einflusses solcher Eigenschaften, diese beschränken sich rein auf die optische Messung von Zellgröße und Kontaktfläche [71]. Vielmehr verringert die Normierung den Einfluss von Verunreinigungen im Messmedium, da für alle Oberflächen die gleiche Zelle im gleichen externen Medium verwendet wurde.

Die Normalisierung stellt sicher, dass einige unerwünschte Effekte, die einzelne Zellen betreffen, in den relativen MDFs verschwinden, während die von den Oberflächenbeschichtungen abhängigen Effekte sowohl in den relativen MDFs als auch in den spezifischen MDFs sichtbar bleiben. Damit sind spezifische MDFs den reinen Mess-MDFs überlegen wenn es um die Auswirkungen von Beschichtungen auf die Zellpopulationen geht. Darüber hinaus war die Anzahl der auf der Referenzoberfläche gemessenen Zellen höher als auf den anderen Oberflächen. Dadurch wurde die Standardabweichung der Referenz-MDFs und damit die Zuverlässigkeit der erhaltenen spezifischen MDFs direkt erhöht. Dennoch sollten die MDF-Differenzen zwischen Zellen eines Typs auf den verschiedenen Beschichtungen vor und nach Normierung der Ergebnisse verglichen werden, da spezifische MDFs bestimmte zellspezifische Eigenschaften maskieren können, wie beispielsweise mögliche Unterschiede zwischen Neuronen und Gliazellen innerhalb der PNZ-Population. Dieses war nicht möglich da die Anzahl Zellen zu gering war.

4.2.4. Einfluss von Laminin auf PEI- und PDL-beschichteten Oberflächen auf die initiale Zelladhäsion

Das PEI-Polymer-Grundgerüst besteht aus wiederkehrenden Einheiten von aliphatischen Abstandshaltern und Amingruppen. Die aus dem Grundgerüst ragenden Verzweigungen bestehen aus den gleichen monomeren Einheiten mit primären, sekundären und tertiären Aminogruppen, die überwiegend protoniert und damit wie die Oberfläche des Siliziumnitrids bei pH 7,4 positiv geladen sind. Aus rein elektrostatischer Sicht würden die PEI-Polymere nicht an der Oberfläche binden.

Da in der Literatur die chemische Wechselwirkung von PEI mit Siliziumdioxid (Silicat) genauer untersucht wurde, konnte nur auf diese Ergebnisse zurückgegriffen werden [145]. Die positiv geladenen PEI-Moleküle binden an Siliziumdioxid mit hoher Affinität, allerdings hauptsächlich

durch nicht-elektrostatische Wechselwirkungen. Daher ist plausibel, dass ähnliche nicht-elektrostatische Wechselwirkungen eine vorherrschende Rolle bei der Adsorption von PEI an das positiv geladene Siliziumnitrid spielen, da Siliziumdioxid und Siliziumnitrid ähnliche Kristallgitterstrukturen auf ihren Oberflächen aufweisen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die PEI-Beschichtungen nicht flach auf den Oberflächen adhäreren, sondern nur kurze Abschnitte an der Oberfläche binden und die vorwiegenden Teile des Polymers in Schleifen ins Bulk-Medium ragen [146]. Diese bilden sich bei hoher Ionenstärke in einem weiten pH-Bereich (pH 6 - 9) und sind nach ihrer Bildung stabil gegen pH- und Ionenstärke-Änderungen [146].

Das PDL-Polypeptid ist nicht wie das PEI verzweigt, was zu einer geringeren Anzahl von Aminogruppen pro Polymerkette führt. In ihrer protonierten Form sind diese Gruppen die positiven Ladungsträger für beide Polymere, was darauf hindeutet, dass die Zellen mit den PEI-Beschichtungen eine höhere räumliche Ladungsdichte und eine stärkere elektrostatische Wechselwirkung aufweisen als jene mit der PDL-Beschichtungen.

Wie beim PEI ist auch das PDL-Polypeptid dafür bekannt, dass es an negativen Oberflächen durch elektrostatische Wechselwirkungen mit starken nicht-elektrostatischen Beiträgen adsorbiert. Für PDL können die Polymerketten in verschiedenen Dichten gepackt werden [147]. Aber es konnten keine Informationen über mögliche Schleifenbildungen ähnlich den PEI-Schleifen für die PDL-Beschichtungen in der Literatur gefunden werden.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die positiven Ladungsdichten der Siliziumnitrid- und PEI-Oberflächen vergleichbar sind, was zu den vergleichbaren MDFs bei Kontaktzeiten von 2 und 5 s führt (Abbildung 20). Interessanterweise werden für MC3T3 niedrigere MDFs für die Kontaktzeit von einer Sekunde auf Siliziumnitrid registriert. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die zellulären Oberflächenmoleküle mit den PEI-Schleifen schneller Bindungen eingehen können als mit der flachen Siliziumnitridoberfläche [146]. Dieser Effekt war bei MC3T3-Zellen besonders ausgeprägt.

Im Allgemeinen waren die MDFs auf PEI/Laminin höher als auf PDL/Laminin-Oberflächen. Laminin-111 ist ein 900-kDa-Protein, das in flexiblen Konformationen adsorbiert [148]. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Länge der PEI-Schleifen die Höhe des adsorbierten Proteins erreicht oder etwas länger ist (Abbildung 25). Für alle drei Zelltypen reduziert die zusätzliche Lamininbeschichtung die MDFs im Vergleich zur reinen Siliziumnitridoberfläche oder PEI-Beschichtung, was darauf hindeutet, dass Laminin die anfänglichen unspezifischen elektrostatischen Interaktionsmechanismen reduziert. Dies galt auch für die PNZ, obwohl bekannt ist, dass sie bestimmte Laminin-spezifische Integrine tragen [141,142]. Die spezifischen Integrin-

vermittelten Bindungsmechanismen werden erst nach Kontaktzeiten von mehr als einer Minute wirksam [29], was darauf hindeutet, dass Laminin für alle untersuchten Zelltypen in den Experimenten als geometrischer Abstandshalter wirkt, der den direkten Zellkontakt mit geladenen Oberflächen verhindert.

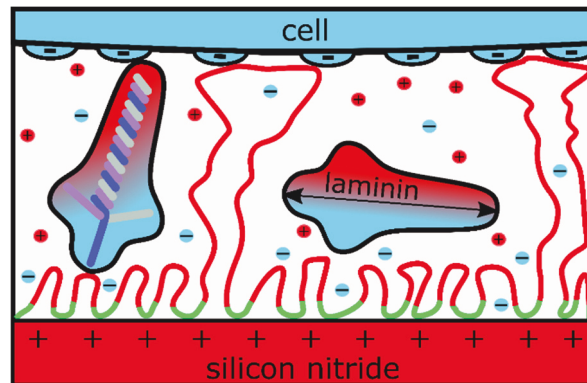


Abbildung 25: Schematische Darstellung einer negativ geladenen Zelloberfläche in Kontakt mit einer PEI/Laminin-beschichteten Siliziumnitridoberfläche. Protonierte Aminogruppen erzeugen die positive Ladung der flexiblen PEI-Polymerkette (rote Segmente). Die positiven Ladungen auf der Siliziumnitridoberfläche erhöhen den pH-Wert über die Doppelschichtlänge und deprotonieren so das PEI-Polymer (grüne Segmente). Die abgeleiteten Segmente werden durch van der Waals-Kräfte an die Oberfläche gebunden. Flexible PEI-Schleifen mit einer Länge von ca. 100 nm können die Lamininschicht überspannen und eine Haftung zwischen den Oberflächen herstellen. Die maximale Länge des länglichen Lamininproteins beträgt ca. 80 nm (Doppelpfeil). Abbildung publiziert in Wysotzki et al. [144].

Die Messungen der Fluoreszenzintensität zeigten, dass die Lamininabdeckung auf den PEI-beschichteten Oberflächen doppelt so hoch war wie auf den PDL-beschichteten Oberflächen. Dementsprechend müssen die noch höheren MDFs auf PEI/Laminin entweder durch eine deutlich höhere Anzahl protonierbarer Aminogruppen von PEI oder deren bessere Zugänglichkeit hergestellt werden. Voraussetzung für die bessere Zugänglichkeit wäre, dass die oben beschriebenen Schleifen in das Bulkvolumen zwischen den Lamininproteinen hineinragen (Abbildung 25). Ein möglicher zusätzlicher Effekt wäre, dass die Ladung der darunterliegenden Beschichtung das Lamininmolekül polarisiert und positive Ladungen auf der gegenüberliegenden Seite des Proteins induziert, die dann mit den zellulären Oberflächenladungen in Wechselwirkung treten. Dieser wäre wahrscheinlich durch die höhere Ladungsdichte stärker auf PEI als auf PDL.

4.2.5. Einfluss der verschiedenen Zelltypen auf die initialen Adhäsionskräfte

Für eukaryotische Zellen beschreiben die meisten Adhäsionsmodelle die Anfangsphase als einen elektrostatisch gesteuerten Prozess, bei dem elektrostatische Wechselwirkungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und van der Waals-Kräfte die Zellen an eine Oberfläche binden [29,45]. Insbesondere gilt dies für prokaryotische Zellen [6]. Für eukaryotische Zellen ist davon auszugehen, dass spezifische Integrin-Interaktionen erst nach mehr als 1 min eine Rolle spielen [29,45]. Dennoch konnte von Dao et al. gezeigt werden, dass nach 120 s Kontaktzeit die MDF von

CHO-Zellen auf Laminin gegenüber mit Antikörpern blockiertem Laminin ansteigt [149]. Der Vergleich mit den hier gezeigten Ergebnissen ist nicht direkt möglich, da in Dao et al. Experimenten eine unspezifisch geladene Oberfläche nicht untersucht wurde.

Die relativen MDFs zeigten klar, dass die vier verschiedenen Oberflächen für jeden Zelltyp etwa die gleichen relativen Kräfte induzierten, obwohl die MDF-Größen stark vom Zelltyp abhängig waren (vgl. Abbildung 23 und Abbildung 24). Dies deutet darauf hin, dass die Adhäsionsmechanismen für alle Zelltypen ähnlich waren, was die Annahme der rein elektrostatischen Wechselwirkung wahrscheinlich macht. Des Weiteren konnten keine Hinweise über spezifische Wechselwirkungen zwischen MC3T3- oder Scc-Zellen mit Laminin gefunden werden. Diese Zellen zeigen sehr ähnliche spezifische MDFs auf PEI/Laminin. Auf PDL/Laminin-Oberflächen dagegen werden ihre spezifischen MDFs unterschiedlich reduziert, was darauf hindeutet, dass die PDL-Basisbeschichtung Scc-Zellen diskriminiert.

Bei eukaryotischen Zellen ist die starke Oberflächenadhäsion Voraussetzung für deren Vermehrung auf der jeweiligen Oberfläche [150]. Neuronale Netzwerke auf PDL/Laminin-beschichteten Oberflächen zeigen beispielsweise geclustertes Zellwachstum, während sie auf reinen PEI-Oberflächen relativ homogene Monoschichten bildeten [51]. Eine homogenere Zellverteilung und höhere neuronale Aktivität wurde auch bei PEI/Laminin-beschichteten Multi-Elektroden-Arrays beobachtet, was mit den etwas höheren Kräften, die von PEI/Laminin im Vergleich zu PDL/Laminin induziert werden, übereinstimmt [122].

4.2.6. Zusammenfassung

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit Zelladhäsionsmodellen, bei denen die Anfangsphase der Adhäsion durch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen negativ geladenen Zellmembranen und positiv geladenen Oberflächen dominiert wird, ohne dass spezifische Adhäsionsmoleküle eine Rolle spielen. Für prokaryotische Zellen ist bekannt, dass elektrostatische Oberflächenwechselwirkungen für die erfolgreiche Bildung von Kolonien entscheidend sind [36]. Dennoch ist nicht sicher, ob eine hohe MDF ein Prädiktor für die Proliferation von prokaryotischen und eukaryotischen Zellen ist, da viele verschiedene Mechanismen erst nach der Anfangsphase wirksam werden [151].

Laminin reduzierte die MDFs für alle Zelltypen, indem es Teile der positiv geladenen Oberflächen abdeckte. Eine ähnliche Reduktion der MDFs für L929-Zellen nach der Fibronektinbeschichtung von Siliziumoxidschichten beobachtet (siehe nächsten Abschnitt). Obwohl die Lamininbedeckung bei PEI höher war als bei PDL, waren die MDFs für PEI/Laminin immer noch höher als für PDL/Laminin, was sich durch die langen Schleifen erklären lässt, die PEI bilden kann und deshalb über die abschirmende Lamininschicht herausragt. Interessanterweise zeigen MC3T3- und Scc-Zellen sehr ähnliche spezifische MDFs auf PEI/Laminin. Ihre spezifischen MDFs werden auf PDL/Laminin-Oberflächen unterschiedlich stark reduziert, was darauf hindeutet, dass die PDL-Basisbeschichtung Scc-Zellen diskriminiert. In diesem Zusammenhang könnte man spekulieren, dass die elektrostatische Wechselwirkung mit den PEI-Schleifen für die initiale Adhäsion der kleineren prokaryotischen Zellen wichtiger ist als für eukaryotische Zellen.

Um die Besonderheiten der Zelltypen hervorzuheben und die statistische Signifikanz zu erhöhen, wurden die MDFs auf eine Referenzoberfläche normiert. Die Umwandlung der erhaltenen relativen MDFs in spezifische MDFs führte zu einem neuen Parameter, der auch auf andere SCFS-Daten angewendet werden kann.

4.3. Vergleich der Initial- mit der Langzeitadhäsion mit SCFS und FluidFM

Der vorige Abschnitt beschränkte sich auf die Betrachtung der ersten Phase der initialen Zelladhäsion, durch die maximale Kontaktzeit von 5 s. Chemischen Immobilisierungsverfahren für Zellen am Cantilever erlauben, je nach Zell-Oberflächen-Kombination, eine maximale Kontaktzeit im Minuten-Bereich [95]. Durch die Entwicklung der FluidFM®-Technik, wie in 2.1.3 (d) beschrieben, ist es möglich, durch das Anlegen eines Unterdrucks an der Spitze des Cantilevers Zellen in Phase 3 der Zelladhäsion mit maturierten Fokalkontakten von einer Oberfläche abzulösen [76].

Da der Lehrstuhl für Biophysik über kein FluidFM® verfügte, wurde mit Frau Dr. Ana Sancho¹⁴ kooperiert. FluidFM® hat gewisse Einschränkungen bei der Wahl der Oberfläche. Es können nur durchsichtige Oberflächen und Beschichtungen untersucht werden, da die Ausrichtung des Cantilevers, die Annäherungs- und Abrissphase optisch mit einem inversen Mikroskop überwacht werden müssen. Auch ist diese Technik noch nicht umfassend etabliert, daher fand sich, anders als bei der traditionellen SCFS, vergleichsweise wenig Fachliteratur dazu. Aus diesem Grund wurde hier auf die bekannten Zell-Oberflächen-Kombinationen L929-Fibronektin und MC3T3-Kollagen zurückgegriffen. Die L929-Zelllinie verwendet, weil diese Zellen in der Lage sind, Fibronektin spezifisch zu binden und sie häufig für Biokompatibilitätstests verwendet werden [152,153]. Die MC3T3-Zelllinie wurde gewählt, da diese Zellen über membrangebundene Proteine gezielt mit Kollagen, das eine wichtige Rolle bei der Knorpel- und Knochenbildung spielt, interagieren können [154–156]. Als unspezifische Oberfläche dienten für beide Zelltypen unbeschichtete Glasdeckgläschen.

Die Vorbehandlung und Beschichtung konnten durch standardisierte Protokolle in Würzburg und Rostock exakt gleich durchgeführt werden. Darüber hinaus wurden die verwendeten Zellen zwischen den beiden Lehrstühlen ausgetauscht, damit Abweichungen zwischen den jeweils verwendeten L929- und MC3T3-Zelllinien ausgeschlossen werden konnten.

¹⁴ Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe in der Medizin und der Zahnheilkunde, Universität Würzburg, Prof. Groll

4.3.1. SCFS

Für die SCFS-Experimente wurden mit Kontaktzeiten von 5, 15 und 30 s durchgeführt. Die gewählten Kontaktzeiten decken die erste Phase der Initialadhäsion ab, da im Allgemeinen die ersten 5-20 min des Zell-Oberflächen-Kontakts als initiale Adhäsion betrachtet werden. Längere Kontaktzeiten waren nicht möglich, da sonst die Ablösekraft die Zell-Cantilever-Verbindung gelöst hätte, was in Vorexperimenten der Fall war. Auf eine Normierung der MDFs auf eine Referenzoberfläche wurde verzichtet, da dies nur für die SCFS möglich war, aber nicht für die FluidFM®-Ergebnisse, da bei FluidFM® für jede Kraft-Abstands-Kurve eine neue Zelle benötigt wurde.

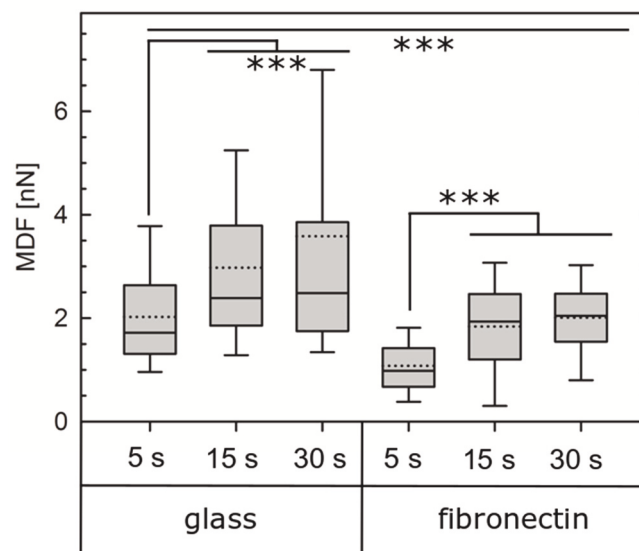


Abbildung 26: Maximale Ablösungskräfte (MDFs) von L929 auf Glas- und Fibronektinoberflächen in der ersten Phase des initialen Adhäsionsprozesses. Der Vergleich der beiden Gruppen bei drei verschiedenen Kontaktzeiten (5 s, 15 s, 30 s) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied. Das Signifikanzniveau ist für $p \leq 0,01$ (***) markiert. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Mittelwert und die durchgezogene Linie den Median.

Die Abbildung 26 fasst die Ergebnisse der SCFS-Messungen für die erste Phase der Initialadhäsion von L929-Zellen auf reinem und fibronektinbeschichtetem Glas zusammen. Wie zu erwarten war, nimmt die MDF mit zunehmender Kontaktzeit auf fibronektinbeschichtetem und unbeschichtetem Glas zu. Der Anstieg der MDF auf Glas zwischen 15 und 30 s war signifikant geringer als der Anstieg zwischen 5 und 15 s. Außerdem stieg bei unbeschichtetem Glas die Standardabweichung mit längeren Kontaktzeiten. Die an Fibronektin durchgeführten Messungen verhielten sich unterschiedlich, die Standardabweichung stieg von 5 s auf 15 s und sank von 15 s auf 30 s, was auf eine Stabilisierung des Zelloberflächen-Kontaktmechanismus hinweist. Die signifikanten Unterschiede zwischen Glas und Fibronektin in den MDFs zeigten, dass die MDFs bei unbeschichtetem Glas signifikant erhöht wurden. Dies führt zu der Annahme, dass in der ersten

Phase der Zellanhaftung der Mechanismus der Zell-Oberflächen-Interaktion überwiegend durch elektrostatische Kräfte gesteuert wird, da der spezifische Adhäsionsmechanismus durch Lock-and-Key-Interaktion gesteuert wird. Dies erfordert eine präzise Ausrichtung und Lokalisierung von fibronektinadhäsionsfördernden Membranproteinen, die mehr als 10 min [29]. Auch die Hochregulation der spezifischen Gene und die Produktion von Proteinen benötigen eine gewisse Zeit, die nach 30 s nicht erreicht werden kann.

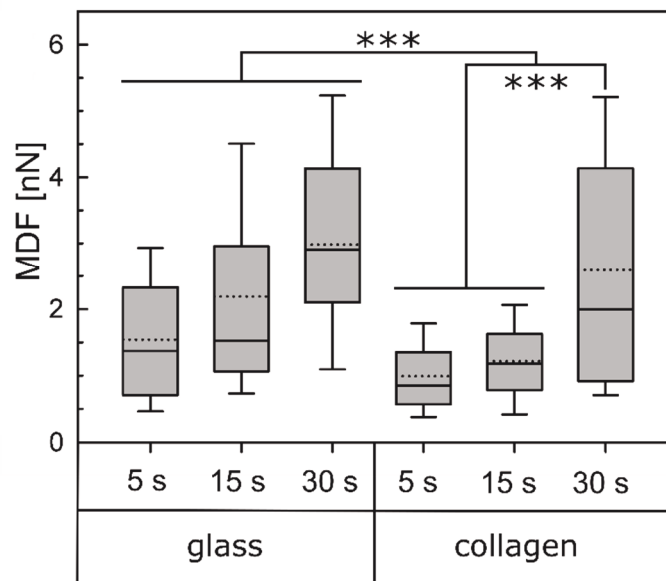


Abbildung 27: MDFs von MC3T3-Zellen auf Kollagenfilmen und unbeschichteten Gläsern in der ersten Phase der Anfangsadhäsion. Unterschiede zwischen der Glas- und der Kollagengruppe sind zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant (***: $p \leq 0.01$). Die gestrichelte Linie repräsentiert den Mittelwert und die durchgezogenen Linie den Median.

Um auszuschließen, dass die auftretenden Effekte nur für L929-Zellen galten, wurde eine weitere Zell-Oberflächen-Kombination untersucht. Hierzu wurden die gleichen Glasoberflächen mit fibrillärem Kollagen Typ I beschichtet, was zu einer weicheren Oberfläche führt. Im Gegensatz zu den Messungen mit fibronektinbeschichteten Oberfläche wurden MC3T3-Zellen für die verwendet.

Genau so wie mit den L929-Zellen zeigten die SCFS-Messungen mit den MC3T3-Zellen in der ersten Phase der Anfangshaftung, dass die MDFs auf den unbeschichteten Glasoberflächen höher waren als auf den Kollagenfilmen (Abbildung 27). Auch lagen die gemessenen MDFs ebenfalls mehr oder weniger in der gleichen Größenordnung wie die der L929-Zellen. Darüber hinaus zeigte sich eine Erhöhung der MDFs auf Glas mit Zunahme der Kontaktzeit, ähnlich dem Verhalten der L929-Zellen. Dagegen nahm die Standardabweichung auf Kollagen mit zunehmender Kontaktzeit nicht ab, was auf eine instabile Interaktion hindeutet.

4.3.2. FluidFM®

Für die FluidFM® wurden L929-Zellen für 24, 48 und 72 Stunden auf der reinen Glasoberfläche und den fibronektinbeschichteten Glasoberflächen kultiviert. Zu diesen Zeitpunkten sollte die Übergangsphase von der Initialadhäsion zur maturierten Adhäsion abgeschlossen und eine stabile Zell-Oberflächen-Interaktion etabliert sein. Die in dem FluidFM-Aufbau verwendeten Cantilever und Zellen sind in Abbildung 28 dargestellt. Auf dieser Abbildung ist gut zu erkennen, dass sich die Zellen vollständig verteilt und die fokalen Adhäsionen ausgereift sind (Abbildung 28b).

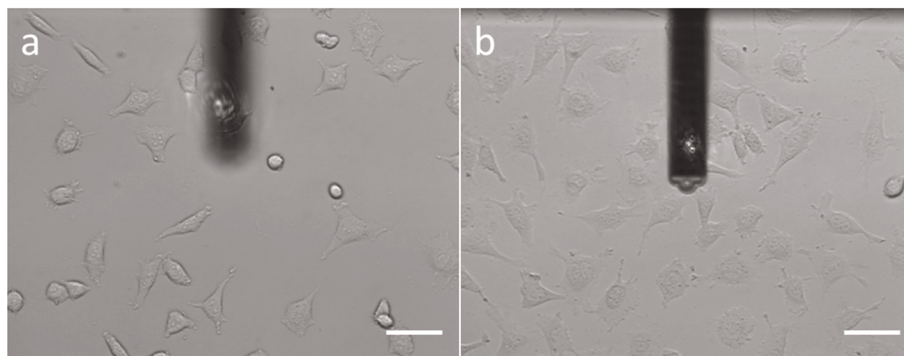


Abbildung 28: Hellfeldaufnahmen von FluidFM®-Cantilevern über L929-Zellen auf Glas (a) und Fibronektinbeschichtung (b) einen Tag nach der Zellaussaat (DIV 1). Links: Cantilever in Annäherungsposition; rechts: Cantilever nähert sich. Maßbalken 50 µm.

Die Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse der FluidFM®-Messungen auf Glas und Fibronektin. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den SCFS-Ergebnissen, so fällt auf, dass die Tendenzen zwischen Glasoberflächen und fibronektinbeschichteten Oberflächen konträr war. Die L929-Zellen hafteten stärker an die mit fibronektinbeschichteten Oberflächen als an das Glas. Über die Anzahl der Tage in Kultur (DIVs– engl. „days *in-vitro*“) zeigte sich, dass sich die MDFs nicht wesentlich änderten. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die Zellen schon nach DIV 1 das stabile Adhäsionsregime erreicht und die Übergangsphase hinter sich gelassen hatten (Abbildung 29). Die Standardabweichung war bei Glas wesentlich geringer als bei Fibronektin, was auf die Heterogenität der Fibronektinbeschichtung im Mikromaßstab zurückzuführen ist.

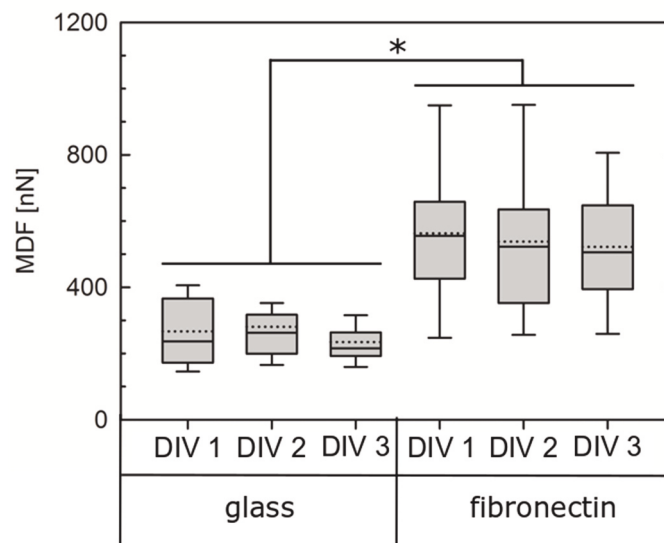


Abbildung 29: MDFs von L929-Zellen auf Glas und Fibronectinbeschichtung nach vollständiger Spreitung und Reifung der fokalen Kontaktpunkte. Unterschiede zwischen den Gruppen sind zu den drei Zeitpunkten statistisch signifikant (*: $p < 0,05$). Die gestrichelte Linie repräsentiert den Mittelwert und die durchgezogene Linie den Median. (DIV - Tage in vitro)

Im Fall der MC3T3-Zellen konnten nur zwei Zeitpunkte untersucht werden, da die Zellen aufgrund ihrer hohen Proliferationsrate am dritten Tag auch bei einer sehr geringen Zelldichte in direktem Kontakt miteinander standen. Um sich nur auf die Kräfte der Zellsubstrats-Wechselwirkungen zu fokussieren und zu vermeiden, die Kraft der interzellulären Wechselwirkungen zu den Adhäsionskräften der Zellen auf das Substrat zu addieren, wurden Messungen über den zweiten Tag hinaus nicht berücksichtigt [151].

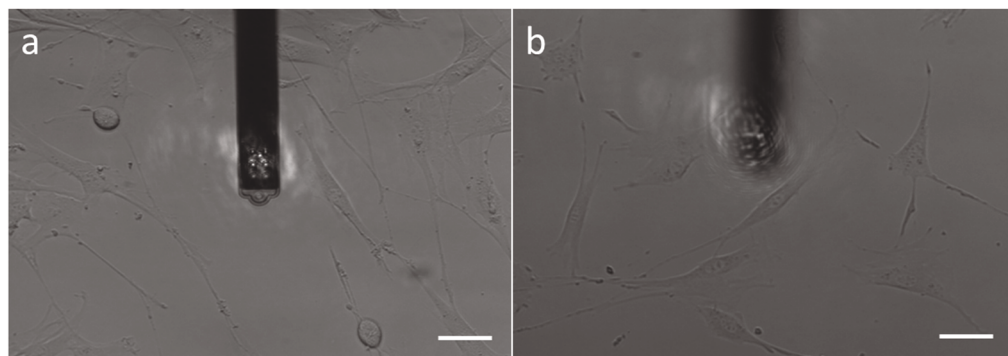


Abbildung 30: Hellfeldbilder von FluidFM®-Cantilevern über MC3T3-Zellen auf Glas (a) und auf Kollagenbeschichtung (b) einen Tag nach der Zellaussaat. Links: Cantilever in Annäherungsposition; rechts: Cantilever nähert sich. Maßbalken 50 μm .

Für die MC3T3-Zellen zeigte sich im Vergleich zu den L929-Zellen ein anderes Ergebnis (Abbildung 31). Sobald der stabile Adhäsionszustand erreicht war und die Zellen vollständig ausgebreitet und fest mit dem Substrat verbunden waren, folgten sie nicht mehr der entgegengesetzten Tendenz in Bezug auf die Ablösungskräfte, die in der ersten Phase der Initialadhäsion auf die beiden Substrate

ausgeübt wurden. Auf Kollagen waren die mittleren MDFs etwas höher als auf Glas. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 31).

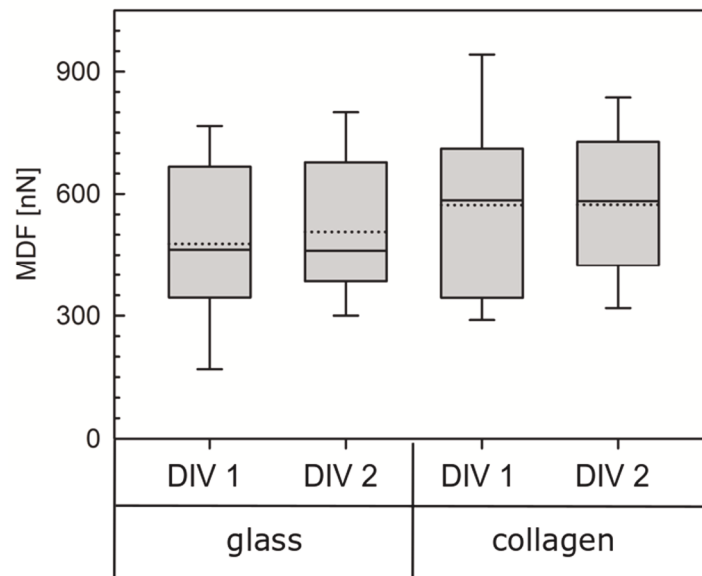


Abbildung 31: MDF von MC3T3-Zellen auf Kollagenfilmen im stabilen Adhäsionszustand, nach vollständiger Spreizung und vollständiger Reifung der fokalen Adhäsionen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Glas und Kollagen waren nicht vorhanden (DIV - Tage in-vitro).

4.3.3. Fluoreszenzaufnahmen des Aktin-Zytoskeletts von L929- und MC3T3-Zellen auf Glas, Fibronketin und Kollagen Typ I

Die Fluoreszenzaufnahmen des Aktin-Zytoskeletts der L929-Zellen zeigten, dass Zellen, die auf Fibronketin ausgesät wurden, flacher sind, eine größere Ausbreitungsfläche aufweisen und Zytoskelett-Unterschiede gegenüber denen auf Glas aufwiesen (Abbildung 32, oben). Es ist bekannt, dass die Zellausbreitung von L929-Zellen durch die Anwesenheit, sowie Dichte der Fibronketinschicht beeinflusst wird [157]. Die Phalloidininfärbung zeigte vielmehr, dass Zellen, die auf Fibronketin kultiviert wurden, eine erhöhte Menge von Aktinfilamenten ausbilden, was zu festeren Adhäsionen führt (Abbildung 32, links-oben). Insgesamt ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Unterschiede im Aktin-Zytoskelett zusammen mit der vergrößerten Ausbreitungsfläche der Zellen auf den fibronketinbeschichteten Oberflächen die Ursache für die stärkeren mit FluidFM® gemessenen MDFs war.

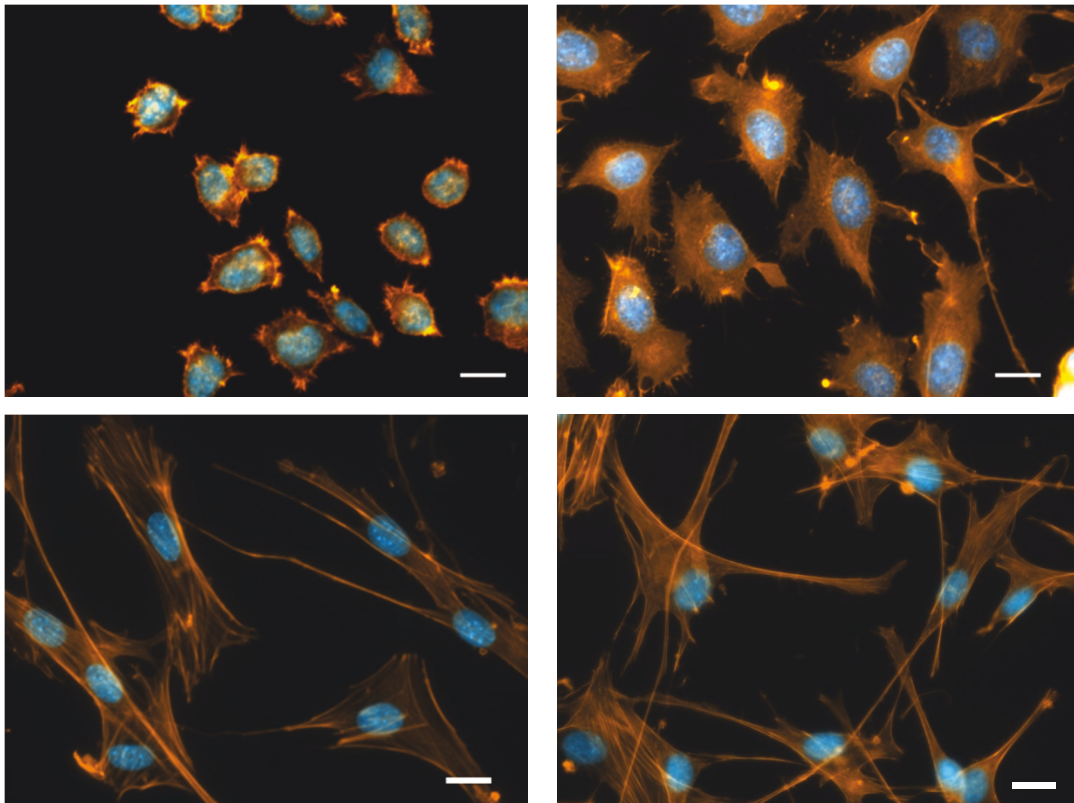


Abbildung 32: Fluoreszenzbilder von L929- (oben) und MC3T3-Zellen (unten) L929-Zellen (DIV3) die auf Glas (links) und Fibronectin (rechtsoben) sowie die MC3T3 (DIV2) auf Kollagen Typ I (linksunten) kultiviert wurden. F-Actin im Zytoskelett wurde durch Phalloidin (gelb/orange) und die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Maßbalken: 20 μm .

Wie in Abbildung 30 dargestellt, war die Verteilung der MC3T3-Zellen im Gegenteil zu den L929-Zellen auf den beiden Oberflächen mehr oder weniger identisch. Dies wurde durch Fluoreszenzbildgebung bestätigt, die verdeutlichen, dass die Stressfasern im Aktin-Zytoskelett auf Glas und Kollagen sehr ähnlich sind (Abbildung 32, unten). Im Gegensatz zu Fibronectin, wo die Zellausbreitung zunahm und im Vergleich zu Glas eine erhöhte Menge an Aktinfilamenten beobachtet wurde, wiesen auf Kollagen gesäte Zellen weder Unterschiede in der Zellausbreitung noch in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts auf. Diese Tatsache steht im Einklang mit den nicht signifikanten Unterschieden in den MDFs zwischen den beiden Oberflächen, die in der späten Adhäsionsphase gemessen wurden. Eine geringeres Elastizitätsmodul des Kollagenfilms unter 50 Pa [158,159] hätte auch eine deutlichere Erhöhung der Haftkräfte entgegen wirken können, da bekannt ist, dass Zellen die Substratsteifigkeit und Mikrostruktur wahrnehmen und entsprechend darauf reagieren [160–162].

4.3.4. Kontaktwinkelmessung an Glas, Kollagen Typ I und Fibronektin

Die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen mit Analysenwasser auf den Versuchsflächen sind in der Tabelle 4 zusammengefasst. Die Winkel waren bei reinem Glas und bei mit Kollagen oder fibronektinbeschichtetem Glas etwa gleich. Daher kann man davon ausgehen, dass die Benetzbarkeit wahrscheinlich kein Prädiktor für MDFs im frühen oder späten Stadium der Zelladhäsion für die gewählten Zell-Oberflächen Kombinationen ist.

Tabelle 4: Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen mit Reinstwasser auf Glas, Kollagen Typ I und Fibronektin.

	Glas	Kollagen	Fibronektin
Kontaktwinkel	52,3° +/- 2,3	47,6° +/- 7,4	40,6° +/- 5,7

4.3.5. Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse eine unterschiedliche Tendenz der Ablösekräfte zwischen der frühen Phase der anfänglichen Zelladhäsion und der späten Adhäsionsphase beim Vergleich von unspezifischer und spezifischer Adhäsion. Während die Zellen in der Frühphase stärker auf den unspezifischen, unbeschichteten Substraten hafteten, neigten die Zellen in der späteren Phase dazu, stärker auf den Oberflächen mit den spezifischen Adhäsionsproteinbeschichtungen zu haften. Diese Ergebnisse zeigen entscheidende Unterschiede in den Mechanismen der frühen Phase und der späten Phase der Zelladhäsion. Während in der Frühphase die elektrostatische Wechselwirkung [45] und die Membranspannung [163] die dominanten Faktoren für die Anfangshaftung sind, wird die Adhäsion von Zellen an das Substrat in der Spätphase hauptsächlich durch die Eigenschaften der fokalen Komplexe bestimmt, wenn die Zellausbreitung bereits abgeschlossen ist und Fokalkontakte etabliert wurden [30,36,164]. Obwohl die Adhäsion ein relativ schneller Prozess ist, erfolgt die Aggregation von Vinculin und Cadherinen nach 100 s Kraftinduktion [165] zu fokale Adhäsionskomplexen mehrere Minuten [166], obwohl aktuelle Studien gezeigt haben, dass bestimmte Integrine in weniger als einer Sekunde auf Last reagieren [167]. Insgesamt zeigen die in den Experimenten verwendeten unterschiedlichen Kontaktzeiten für die Anfangsphase der Adhäsion im und Spätphase der Haftung die unterschiedlichen Haftungsmechanismen.

4.4. Beeinflussung der Zelladhäsion von Prokaryoten und Eukaryoten durch den pH-Wert

4.4.1. SCFS-Messungen an MC3T3-Zellen

Es ist bekannt, dass ein leicht alkalischer pH-Wert die Proliferation von Knochenzellen positiv beeinflusst [168,169]. Ein leicht alkalischer pH-Wert führt nicht nur zu einer erhöhten Proliferation, sondern erhöht auch die Menge an sekretiertem Kalzium bei MC3T3-Zellen, was ein direkter Indikator für eine erhöhte Kalzifizierungsrate ist [168]. Für die Verbesserung der Einbettung eines Implantats sind die Initialadhäsion sowie die Verbesserung der Implantat-Knochen-Wechselwirkungen von besonderer Bedeutung. Im Folgenden wird die pH-Anhängigkeit der ersten Phase der Initialadhäsion von Osteoblasten-ähnlichen MC3T3-Zellen untersucht.

Für die Messung der MDFs bei verschiedenen pH-Werten wurde eine einzelne MC3T3-Zelle am Cantilever immobilisiert, über der reinen oder kollagenbeschichteten Titanoberfläche ausgerichtet und mindestens 20 Kraftabstandskurven mit einer jeweiligen Kontaktzeit von 5 s aufgenommen. Nachdem auf beiden Oberflächen ein vollständiger Messzyklus durchgeführt war, wurde der pH-Wert des Mediums durch Spülen mit Hilfe eines Spritzensystems geändert. Die Reihenfolge der beiden pH-Stufen wurde variiert, um auszuschließen, dass der gemessene Effekt durch die Abfolge beeinflusst wird. Ein Beispiel für zwei Kraftabstandskurven bei pH 7,4 und 8,0 ist in Abbildung 33 gegeben.

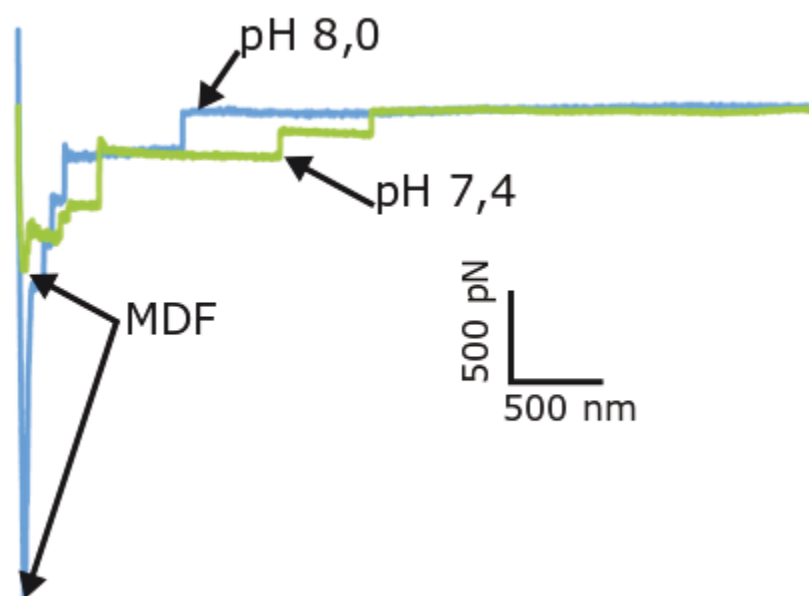


Abbildung 33: Beispiel zweier Kraft-Abstands-Kurven von derselben Zelle auf kollagenbeschichtetem Titan bei pH 7,4 (grün) und 8,0 (blau).

Es ist klar zu erkennen, dass die MDF im leicht alkalischen Bereich höher ist. Die Abbildung 34 zeigt die Ergebnisse der relativen MDFs aller Messungen. Die mittleren MDFs bei pH 7,4 wurde für jede einzelne getestete Zelle auf 100 % gesetzt und die relative Änderung für beide Oberflächen ermittelt.

Für die pure Titanoberfläche lag die Steigerung der MDFs von pH 7,4 zu pH 8,0 bei ca. 64 %. Eine stärkere Ausprägung dieses Effektes war auf den kollagenbeschichteten Oberflächen zu erkennen. Der relative MDF stieg hierbei um 94 % im Vergleich zu pH 7,4, was beinahe einer Verdoppelung der Ablösekräfte entspricht.

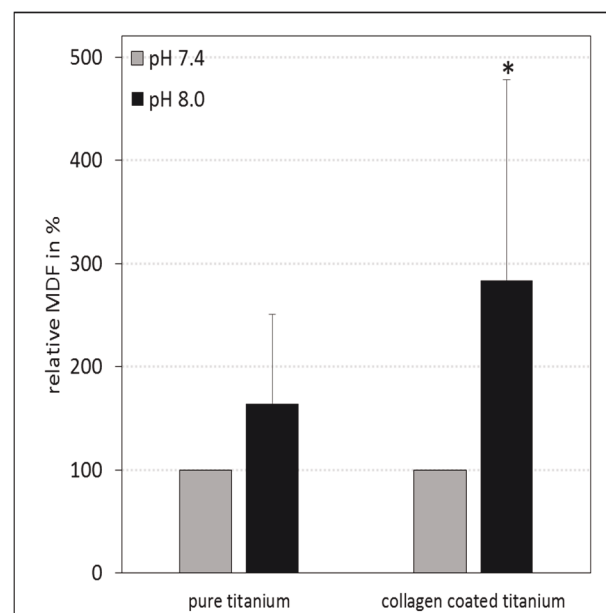


Abbildung 34: Mittlere relative MDFs von MC3T3-Zellen auf unbeschichtetem und kollagenbeschichtetem Titan (n=8; p<0.05). Abbildung publiziert in Galow, Wysotzki et al. [169].

Die angeführten Unterschiede waren für die Messungen auf dem kollagenbeschichteten Titan signifikant. Bei den hier eingesetzten Titanoberflächen handelte es sich um reines Titan, mit einer durch den Luftsauerstoff in Titanoxid Oberfläche. Bei medizinischen Implantaten werden häufig Titanlegierungen eingesetzt. Die chemische Zusammensetzung an der Oberfläche enthält nur sehr geringe Mengen der in der Legierung zusätzlich eingesetzten Elemente [170].

Eine stärkere Zell-Oberflächen-Wechselwirkung kann durch mehrere Faktoren ausgelöst werden.



Abbildung 35: Beispielhafte Kraftabstandskurve einer MC3T3-Zelle bei pH 7,4 auf Kollagen zur Verdeutlichung der Bindungsbrüche zwischen Oberfläche und Zelle.

Die Anzahl der Zell-Oberflächen-Kontaktpunkte kann zunehmen. Die gesamte Ablösekraft der Zelle von der Oberfläche steigt, weil mehr Bindungen gebrochen werden müssen, um die gesamte Zell-Oberflächenbindung zu lösen. Einzelne Bindungsbrüche werden teilweise in den Kraft-Abstandskurven sichtbar (Abbildung 35).

Diese Ereignisse zeigen ein charakteristisches Muster in den Kurven, die sich als eine sehr schnelle Abnahme der Auslenkung des Cantilevers ausdrückt und damit zu einem fast senkrechten Anstieg in der Kurve führen. Diese erlaubt diese Ereignisse mit einer einfachen Methode auswerten. Hierzu wurden mit Hilfe eines SciLab¹⁵-Skriptes die einzelnen Kraft-Abstandskurven in kurze Segmente unterteilt und an diesen mit Hilfe der linearen Regression, eine Geraden angelegt. Wenn die Steigung der errechneten Grade einen gewissen positiven Wert überschritt wurde dieses als ein Abrissereignis gezählt.

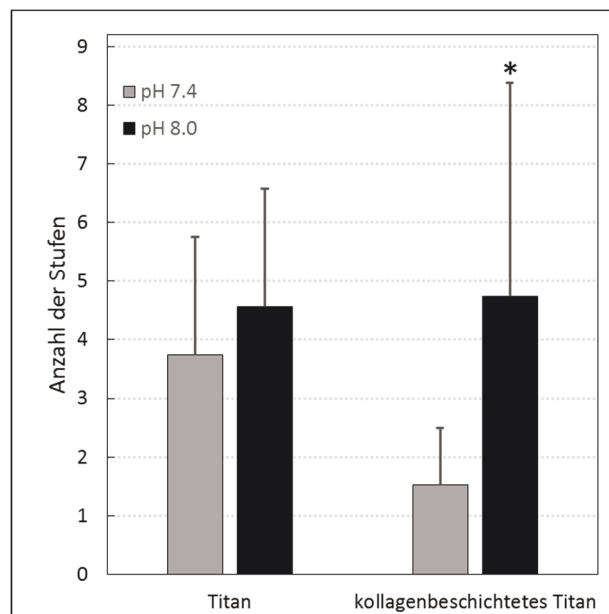


Abbildung 36: Anzahl der Abrissereignisse von MC3T3-Zellen in den Kraft-Abstands-Kurven auf unbeschichtetem und kollagen-beschichtetem Titan (n=8;p<0,05).

Die Abbildung 36 zeigt einen Teil dieser Ergebnisse. Die durchschnittliche Anzahl der detektierten Ereignisse lag bei pH 7,4 auf reinem Titan bei $3,7 \pm 2,0$ und auf kollagenbeschichtetem Titan bei $1,5 \pm 0,97$. Bei pH 8,0 stieg die Anzahl auf $4,6 \pm 2$ (unbeschichtetes Titan) und $4,7 \pm 3,6$ (kollagenbeschichtetes Titan). Auch hier zeigte sich, dass die Ergebnisse nur für die Messungen auf dem kollagenbeschichteten Titan statistisch signifikant waren.

Ein weiterer Faktor, der aus den Daten ermittelt werden konnte, ist der Punkt an dem die Zelle vollständig von der Oberfläche abgelöst war. Die Zelle wird durch den Cantilever mit einer

¹⁵ Scilab 6, Enterprises S.A.S, <http://www.scilab.org/>

konstanten Geschwindigkeit von 5 $\mu\text{m/s}$ fast senkrecht von der Oberfläche abgezogen. Je weiter die Zelle von der Oberfläche entfernt ist, bevor die Zelle sich vollständig von der Oberfläche abgelöst hat, desto länger ist die Lebensdauer der Bindungen. Daher kann aus diesem Wert indirekt auf die Lebensdauer der Zell-Oberflächen-Bindungspunkte geschlossen werden [95]. Die Ergebnisse zeigten, dass durch einen leicht alkalischen pH-Wert die Lebensdauer der Bindungspunkte teilweise signifikant gesteigert wurde. Auf reinem Titan lag die Abrisslänge bei pH 7,4 bei $20,0 \pm 11,0 \mu\text{m}$ und stieg bei pH 8,0 auf $28,7 \pm 15,3 \mu\text{m}$. Im Falle des kollagenbeschichteten Titans zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen pH 7,4 und 8,0. Die Abrisslänge nahm von $12,3 \pm 6,4 \mu\text{m}$ (pH 7,4) auf $29,4 \pm 12,3 \mu\text{m}$ (pH 8,0) zu.

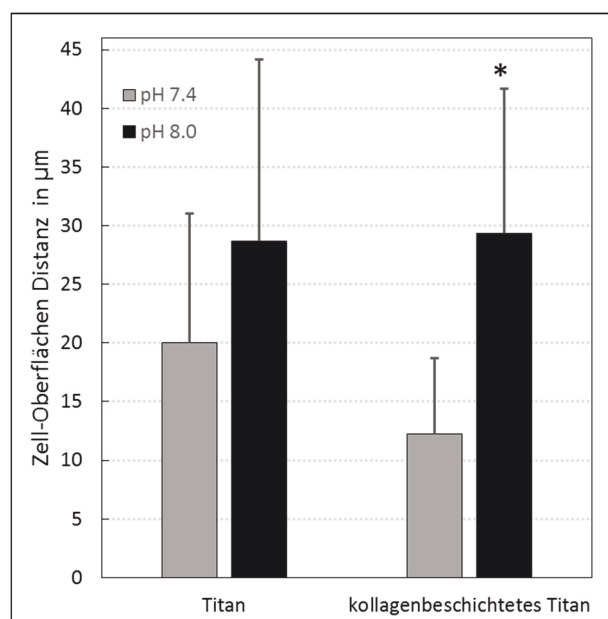


Abbildung 37: Durchschnittliche Distanz zwischen Oberfläche und MC3T3-Zelle, bei der die Zelle vollständig von der Oberfläche getrennt war ($n=8; p<0,05$).

Wie Abbildung 35 zeigt, zeigten sich Abrissereignisse durch Stufen in den Kraftabstandskurven. Die Höhe einer Stufe entspricht der Kraft, die benötigt wird, um den Zell-Oberflächen-Kontaktpunkt zu lösen. Die Abbildung 38 zeigt die Auswertung der Stufenhöhen auf Titan und kollagenbeschichtetem Titan für pH 7,4 und pH 8,0. Es gab weder auf Titan noch auf kollagenbeschichtetem Titan einen statistisch signifikanten Unterschied, daher stellen die erkennbaren Unterschiede lediglich Tendenzen dar. Auf unbeschichtetem Titan zeigten sich zwischen den beiden pH-Werten keine Unterschiede. Auf Kollagen dagegen trat ein leichter Anstieg der Kraft auf. Vergleicht man, unabhängig vom pH, die beiden Oberflächen-Typen, so ist zu erkennen, dass die Kraft eines Abrissereignisses auf Kollagen im Durchschnitt niedriger war als auf reinem Titan.

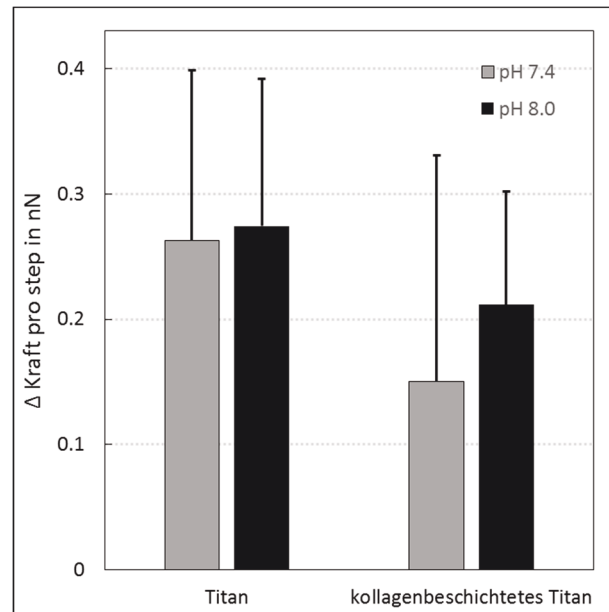


Abbildung 38: Durchschnittlicher Kraftabfall eines Abrissereignisses von MC3T3-Zellen bei pH 7,4 und pH 8,0 auf unbeschichtetem und kollagenbeschichtetem-Titan.

4.4.2. SCFS-Messungen an *Staphylococcus capitis* sub. *capitis* (Scs)

Um ein umfassenderes Bild zu erhalten, wurde auch der Einfluss des alkalischen pH-Wertes auf die Initialadhäsion mit einem Modell-Bakterium bestimmt. Mit dem gleichen Versuchsaufbau wie für die MC3T3-Zellen wurden die relativen MDFs für Bakterien bei pH 7,4 und pH 8,0 auf unbeschichtetem und kollagenbeschichtetem Titan bestimmt. Auf unbeschichtetem Titan ist kein Unterschied zu erkennen, dagegen zeigt sich für die Kollagenbeschichtung eine geringe Abnahme der relativen MDFs von pH 7,4 zu pH 8,0. Dieser ist aber nicht statistisch signifikant. Eine detaillierte Auswertung wie im Falle der MC3T3-Zellen war nicht möglich, da dieser Bakterientyp aufgrund seines zellulären Aufbaus keine Abrissmuster erzeugt.

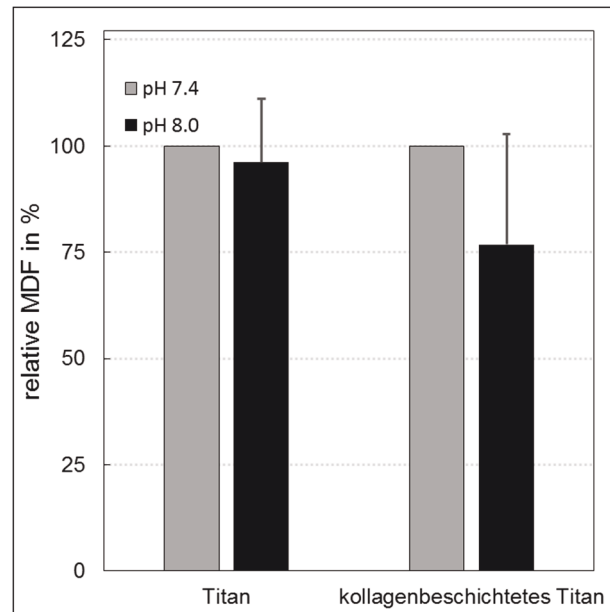


Abbildung 39: Relative MDF von *Stph. capitis sub. capitis* bei pH 7,4 und pH 8,0 auf unbeschichtetem und kollagenbeschichtetem Titan (n=10).

4.4.3. Zeta-Potential-Messung an Titan und kollagenbeschichtetem Titan sowie MC3T3-Zellen und Scc-Zellen

Die Abbildung 40 zeigt den Zeta-Potential-Verlauf von kollagenbeschichtetem und unbeschichtetem Titan in Abhängigkeit vom pH. Bei unbeschichtetem Titan sank das Zeta-Potential von -97 mV auf -118 mV im pH-Bereich von pH 6,3 bis pH 8,6. Dagegen ist das gemessene Zeta-Potential des kollagenbeschichteten Titans um ein Vielfaches niedriger. Die Werte lagen zwischen 2 mV (pH 6,4) und -19 mV (pH 8,6).

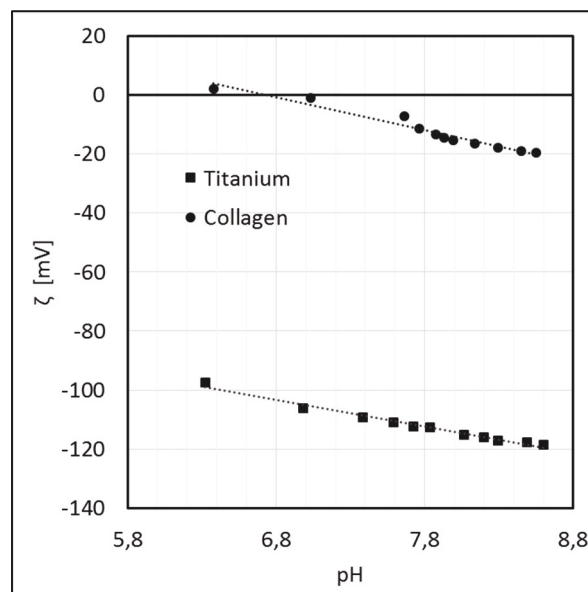


Abbildung 40: pH-abhängiges Zeta-Potential von unbeschichtetem und kollagenbeschichtetem Titan.

Die Abhängigkeit zwischen Zeta-Potential und pH kann in beiden Fällen als mehr oder weniger linear angenommen werden. Daher lässt sich aus der Geradengleichung der Punkt, an dem das Zeta-Potential sich Null annähert, ermitteln. Hierzu wurden die Messpunkte mit einer Geradengleichung gefittet und der x-Achsen-Schnittpunkt bestimmt. Für Kollagen liegt dieser Punkt bei pH 6,72 und für unbeschichtetes Titan bei -4,70 außerhalb eines realistischen Wert. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass das physisorbierte Kollagen Oberflächenladung abschirmt.

Komplementär zu den Oberflächen wurde auch das Zeta-Potential der Zellen bei pH 7,4 und pH 8,0 bestimmt (Abbildung 41). Auf den ersten Blick ist zu erkennen, dass die Scc-Zellen, pH unabhängig ein signifikant negativeres Zeta-Potential hatten als die MC3T3-Zellen. Das Zeta-Potential für die Scc-Zellen lag bei ca. -36 mV, es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden pH-Werten (pH 7,4: -36 mV; pH 8,0: -36,3 mV).

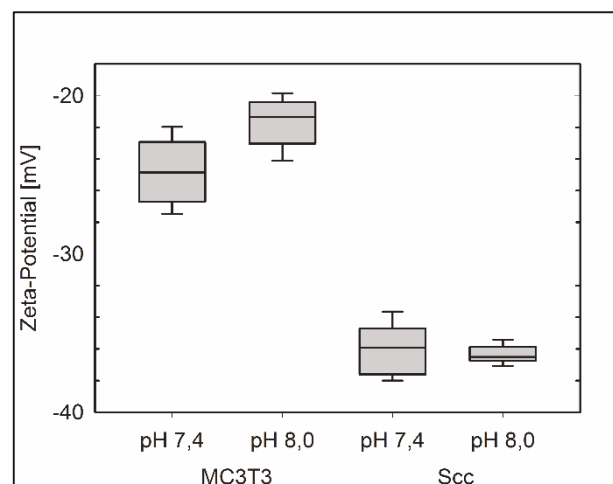


Abbildung 41: Zeta-Potential von MC3T3- und Scc-Zellen bei pH 7,4 und 8,0 (n>20 pro Kondition).

Für die MC3T3-Zellen ergab sich hingegen ein abweichendes Resultat. Das Zeta-Potential stieg von -24 mV (pH 7,4) auf -22 mV (pH 8,0). Trotz dieses geringen Unterschied war dieser dennoch statistisch signifikant.

4.4.4. SCFS-Zellverhalten und Zeta-Potential

Ausschließlich für die MC3T3-Zellen konnte im leicht alkalischen Bereich eine signifikante MDF-Änderung auf der Kollagenoberfläche gezeigt werden. Das Zeta-Potential dieser Zellen ist fast 14 mV höher im Vergleich zu den bakteriellen Zellen. Dagegen nimmt das Zeta-Potential der Oberfläche durch die Beschichtung ca. um den Faktor 10 ab. Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass die elektrostatische Repulsion der negativ geladenen Zell- und Substratoberflächen geringer war. Hingegen wurde das Zeta-Potential mit zunehmendem pH negativer

(Abbildung 41). Eine Anziehung zwischen zwei negativ geladenen Oberflächen kann durch mehrfach geladene Kationen induziert werden, wie im Abschnitt über das Polykation Spermidin besprochen wurde (siehe 4.1). Der verwendete PBS-Puffer enthielt dagegen außer einfach geladenen Natrium- und Kalium-Kationen nur mehrfach negativ geladene Phosphat-Ionen. Geringe Mengen an mehrwertigen Kationen könnten durch die Zellen, die für die Immobilisierung am Cantilever nötig waren, eingebracht worden sein. Je geringer die negative Ladung der Oberfläche war, desto wahrscheinlicher war es, dass diese Ladung durch die geringen Mengen an verschleppten Ionen kompensiert werden konnte. Dagegen spricht, dass es auch zu einer Zunahme der relativen MDFs zwischen pH 7,4 und 8,0 auf dem unbeschichteten Titan kam und sich nur ein vernachlässigbarer Effekt für die Scc zeigten.

Für das Integrin $\alpha_v\beta_3$ ist bekannt, dass durch einen aziden pH die Konformation in den aktivierten (hoch affinen) Zustand wechselt [171]. Es ist vorstellbar, dass es für andere Integrine im alkalischen Bereich gleiche Effekte gibt. Dieses könnte die Integrin-Wechselwirkung beschleunigen und eine effektive Bindung in der verwendeten 5 s-Kontaktzeit induzieren. Des Weiteren spricht für diese Annahme, dass die Anzahl der Bindungen und ihre Lebensdauer für Kollagen im alkalischen pH zunehmen.

4.4.5. Aufbau eines Implantat-Modellsystems zur Optimierung des Anwachsverhaltens von Zellen auf Implantatoberflächen

Auf Basis von Zellkulturexperimenten, Anne-Marie Galow¹⁶ [172] und Sebastian Bonk¹⁶ [173] zu den Effekten des pH-Wertes auf die Proliferation von Zelllinien-Zellen und humanen Osteoblasten und den von mir vorgestellten Ergebnissen, wurde ein Implantat-Modellsystem entwickelt und patentiert [174]. Dieses Implantat-Modellsystem besteht aus einer PVA-Matrix sowie einer perforierten Titanscheibe, die als Zellkulturfläche dient (Abbildung 42). Die PVA-Matrix ist als Reservoir ausgelegt, aus dem langsam über einen längeren Zeitraum Hydroxidionen in das Medium freigegeben werden.

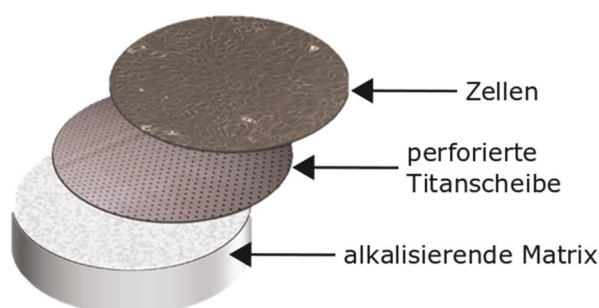


Abbildung 42: Schematischer Aufbau des Implantat-Modellsystems. Die Zellen werden auf der perforierten Titanscheibe ausgesät und die alkalisierende PVA-Matrix gibt sukzessive durch die Löcher Hydroxidionen in das Medium ab.

Die Basis für den Aufbau der Matrix lieferte die Arbeit von Wu et al., die einen neuen Polymerelektrolyt für Zink-Nickel-Batterien entwickelten. Das von ihnen beschriebene PVA-KOH-TiO₂-Polymerelektrolyt hat eine Flüssigkeitsspeicherkapazität von über 50 % wt¹⁷ und kann daher entsprechende Mengen an alkalischer Lösung aufnehmen [125]. Ein weiterer vorteilhafter Aspekt ist die umfangreiche Charakterisierung von Polyvinylalkoholen im Hinblick auf Biokompatibilität und Zytotoxizität [175]. Daher kann man davon ausgehen, dass PVA-Matrices allein keine negativen Auswirkungen auf die Proliferation von Zellen haben. Für die vorgestellte Synthese der Matrix wird KOH eingesetzt. Es ist bekannt, dass erhöhte Kaliumkonzentrationen potentiell zytotoxisch sein können. Da nur die Hydroxidionen eine wichtige Rolle bei der Reaktion spielen, konnte dieses durch Substitution von KOH durch NaOH umgangen werden. Im Hinblick auf die Anwendung im Implantat ist ein weiterer Vorteil, dass das Polymer durch seine Viskoseform kurz

¹⁶ ehemalige MitarbeiterInnen am Lehrstuhl für Biophysik, Universität Rostock

¹⁷ % wt: Gewichtsprozent

nach der Synthese leicht in das Innere eines Implantats injiziert werden kann und dort erst in seine gelartige Form übergeht.

Die perforierte Titanscheibe diente als Zellkulturoberfläche und simulierte gleichzeitig die Oberfläche eines Implantats. Die 50 µm großen Löcher ermöglichen die Diffusion der Hydroxidionen aus der PVA-Matrix über die gesamte Fläche der Titanscheibe in das Medium. Der relative große Abstand von 500 µm zwischen den einzelnen Löchern wirke dagegen limitierend und verhinderte, dass der pH-Wert im Medium zu stark ansteigt.

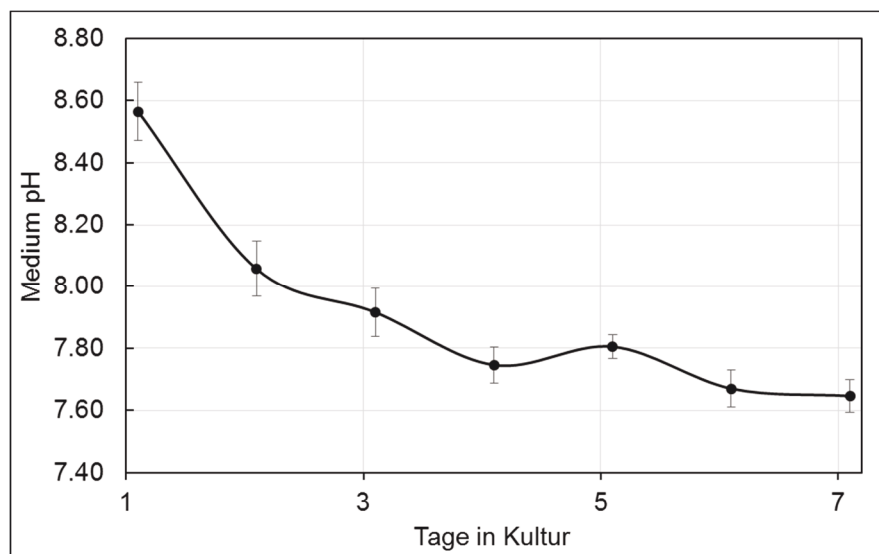


Abbildung 43: pH-Wert im Medium über der alkalisierenden Matrix (1 M NaOH). Die jeweilige Messung fand vor dem Mediumswechsel statt (n=10). Die Abbildung wurde mit Zustimmung aus der Dissertation von Anne-Marie Galow entnommen[172].

Eine Charakterisierung der pH-Wertänderung über einen längeren Zeitraum wurde von Frau Galow¹⁶ durchgeführt. Hierzu wurde das Implantat-Modellsystem mit 2 ml Medium (α -MEM) überschichtet und über sieben Tage täglich nach der Messung des pH-Wertes das Medium vollständig ausgetauscht. In Abbildung 43 ist zu erkennen, dass der pH-Wert über den gesamten Zeitraum im Vergleich zum pH-Wert des auf 7,4 gepufferten Mediums durch die Matrix erhöht wurde.

4.4.6. Einfluss der alkalisierenden Wirkung des Implantat Modells auf eukaryotische Zellen

Um den Einfluss des Implantat-Modells auf eukaryotische Zellen zu charakterisieren, wurden MC3T3-Zellen auf den Titanoberflächen ausgesät. Als Kontrolle dienten ausgewaschene (NaOH-freie) PVA-Matrices oder das Weglassen dieser. Die Zellzahlbestimmung ergab schon signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und dem Implantat-Modell. Nach sieben Tagen war die Zellzahl fast 1/3 höher als in der Kontrolle. Dieses wurde durch WST-1-Assay (water soluble

tetrazolium)-Ergebnisse, welcher die extrazelluläre Menge des NADH indirekt nachweisen, bestätigt [168,172]. Aus den Ergebnissen der Kontrollen war es auch möglich zu schließen, dass keinerlei negative Effekte der PVA-Matrix auf die Zellen festzustellen waren. Da die Titanoberflächen nicht transparent waren, konnte die Morphologie der Zellen nur durch Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht werden. Hierzu wurde ein Konfokalmikroskop eingesetzt, damit ein Einblick in die Löcher möglich war [172]. Die Abbildung 44 zeigt das Ergebnis der Aufnahmen. Es ist gut zu erkennen, dass die Zellen auf der gesamten Oberfläche wachsen und selbst die Löcher ausfüllen und überspannen.

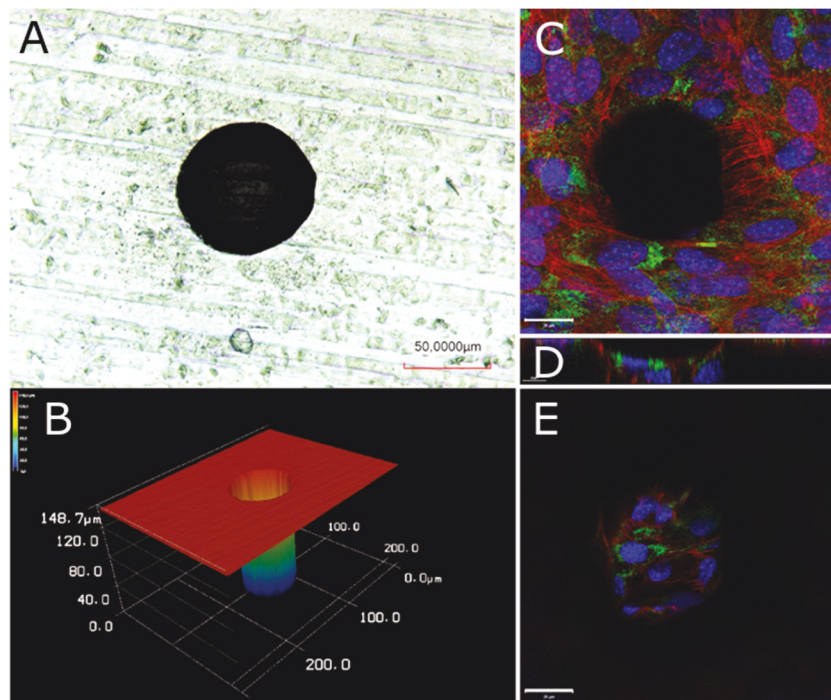


Abbildung 44: Konfokalmikroskopische Aufnahmen eines Loches in der Titanoberfläche des Implantatmodellsystems. (A u. B) Dimensionen eines Loches nach der UKP-Bearbeitung. Ausschnitt des MC3T3-Zellrasen von oben(C) und am Boden des Loches (E), sowie Querschnitt durch das Loch(D). Angefärbt sind die Zellkerne in blau (DAPI), das Aktin- Zytoskelett in rot (TRITC) und Kollagen in grün (Primärantikörper + A488- gekoppelter Sekundärantikörper). Die Abbildung wurde mit Zustimmung aus der Dissertation von Anne-Marie Galow entnommen [172].

4.4.7. Einfluss der alkalisierenden Wirkung des Implantat Modells auf prokaryotische Zellen

Aus den SCFS-Daten ergibt sich, dass ein alkalischer pH-Wert von 8,0 keinen signifikanten Einfluss auf die Initialadhäsion von Scc hat. Dennoch können andere Faktoren, die durch den alkalischen pH beeinflusst werden, das Wachstum beeinflussen. Im Hinblick auf die *in-vivo*-Anwendung eines alkalisierenden Implantats sollte im besten Fall die Menge an Bakterien, die auf der Titanoberfläche wächst, minimiert oder nicht beeinflusst werden.

Anhand der Tabelle 5 ist klar zu erkennen, dass die alkalisierende Matrix das Wachstum von dem hier verwendeten Bakterium förderte. Bakterien geben Abfallprodukte ihres Stoffwechsels ab, die das umgebende Medium ansäuern. Die Freisetzung der Hydroxyd-Ionen aus der PVA-Matrix wirkt dem pH-Abfall entgegen und verlangsamt diesen. Daher wurde das bakterielle Wachstum durch den pH-Wert erst später gehemmt. Um diesem Effekt entgegen zu wirken, war es möglich, die PVA-Matrix mit Pen/Strep zu beladen. Dieses tötete alle Bakterien, was in den Fluoreszenzaufnahmen zu erkennen ist (Abbildung 45).

Tabelle 5: Anzahl der koloniebildenden Einheiten (CFU – engl. „colony forming units“) auf dem Implantatmodell. Die Kontrolle enthält eine ausgewaschene PVA-Matrix. Bei der Herstellung wurde einem der beiden Ansätze der Spüllösung 2 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) hinzugefügt. Anzahl der Replikate pro Kondition ist 5.

	Kontrolle	Ansatz (ohne Pen/ Strep)	Ansatz (mit Pen/Strep)
CFU	36	51	0
Std. A.	±14	±22	±0

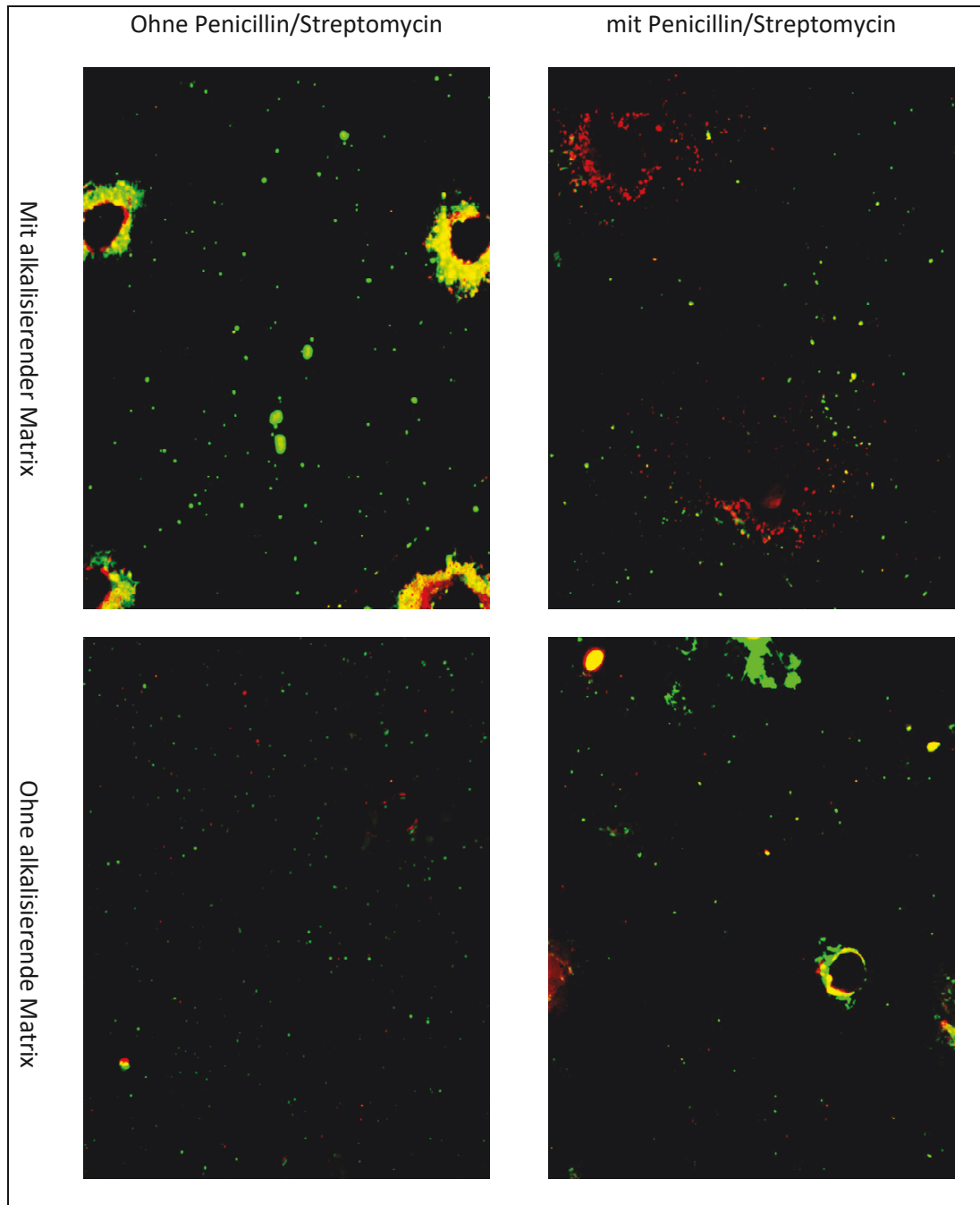


Abbildung 45: Fluoreszenz-Aufnahmen des „Dead/Live-Assays“ auf perforierten Titanoberflächen. Die Abbildungen zeigen jeweils den Einfluss der alkalisierenden Matrix mit bzw. ohne Penicillin/Streptomycin sowie mit und ohne alkalisierender Matrix. Rot entspricht Propidiumiodid und Grün CYTO 9.

5. Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern eine Reihe von Antworten zur prokaryotischen und eukaryotischen Zelladhäsion, werfen aber dennoch neue Fragen zu diesem komplexen Thema auf. Die Experimente mit Spermidin zeigten, dass Spermidin eine elektrostatische Anziehungskraft zwischen negativ geladenen Borosilikat- und Glimmer-Oberflächen erzeugen kann. Dabei war es möglich, die Stärke der induzierten Anziehungskräfte über die Spermidinkonzentration und den pH-Wert zu regulieren. Die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes zur Beschreibung der pH-Abhängigkeit der Spermidin-induzierten MDF lieferten erste Ansätze für ein phänomenologisches Modell. Die Vorhersagekraft des Modells ist jedoch dadurch eingeschränkt, dass die Kraftkoeffizienten (f_2 , f_3), die die Konzentration der unterschiedlich geladenen Spermidinspezies in einen Kraftanteil umwandeln, von der Gesamtkonzentration des Spermidins abhängig sind. In Zukunft sollte angestrebt werden, das phänomenologische Modell der Spermidin-induzierten MDFs durch Korrekturterme zu erweitern, die die Oberflächen- sowie die Konzentrationsabhängigkeit der beiden Kraftkoeffizienten beschreiben. Der Einsatz von Spermidin könnte ein möglicher neuer Ansatz sein, die Zell-Implantat-Wechselwirkung zu verstärken. In diesem Zusammenhang ist möglicherweise interessant, dass eine erhöhte Aufnahme von Polyaminen wie Spermidin altersbedingte Krankheiten verhindern und die Lebenserwartung verlängern kann [176,177]. *In-vitro* führt der Mangel an zellulärem Spermidin zu einem vollständigen Stillstand der Translation und des Wachstums in Säugerzellen [178], was die Notwendigkeit weiterer *in-vitro* und *in-vivo* Experimente zeigt.

Bei der Untersuchung von Zell-Oberflächenwechselwirkungen konnte mit der SCFS naturgemäß nur eine kleine Auswahl von Zellarten, Oberflächen und Oberflächenbeschichtungen untersucht werden, die in der Zukunft auf weitere Kombinationen ausgedehnt werden sollte. So könnte eine umfangreiche Datenbank aufgebaut werden um *in-vitro*- und *in-vivo*-Daten zu korrelieren. Durch die in dieser Arbeit eingeführten relativen und spezifischen MDFs wird die Vergleichbarkeit hierfür verbessert. Auf Basis dieser Daten könnte dann einfacher nach neuen Beschichtungen für spezifische medizinische Anwendungen gesucht werden.

Die Ergebnisse der SCFS-Experimente zum Einfluss von Beschichtungen auf die Initialadhäsion zeigen, dass nicht-spezifische, elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Zellmembran und den positiv geladenen Oberflächen dominieren, was den verstärkenden Einfluss unterstreicht, den Spermidin auf die initiale Zelladhäsion haben könnte.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Universität Würzburg eine der wenigen Standorte, die über ein FluidFM® Gerät mit einem z-Verfahrweg von 100 µm verfügen. Diese Technik ist eine sehr gute Ergänzung zur SCFS, weil sie die Adhäsionskraftmessungen auf alle Phasen der Zelladhäsion erweitert. Obwohl die hier diskutierten Ergebnisse auf zwei unterschiedliche Zell-Oberflächen-Kombinationen begrenzt waren, zeigten sich bereits signifikante Unterschiede zwischen beiden Kombinationen. Deshalb sollten in einem ersten zukünftigen Schritt beide Zell-Oberflächen-Kombination untereinander getauscht werden. Insbesondere wäre es interessant, die spezifischen Bindungssequenzen auf der Zelloberfläche, aber auch auf den Beschichtungen mit Antikörpern zu blockieren um den Wechselwirkungsmechanismus detaillierter zu erforschen. Der Einsatz von Antikörpern wäre auch möglich, um den Mechanismus der pH-abhängigen MDFs von MC3T3-Zellen auf Kollagenbeschichtungen näher zu untersuchen, da so bestimmt werden könnte, ob der Mechanismus auf spezifischen oder unspezifischen Wechselwirkungen beruht.

Das entwickelte Implantat-Modellsystem wurde erfolgreich *in-vitro* charakterisiert. Der Übergang zu *in-vivo* Studien wäre ein erster Schritt für die Entwicklung neuer medizinischer Implantate. In der Zahnmedizin werden heute bereits Substanzen eingesetzt, die durch einen alkalischen pH, die Infektionen mit Bakterien verhindern sollen [179–181]. Um einen bakteriziden Effekt zu erzielen sind jedoch stark alkalische pH-Werte nötig, die eukaryotischen Zellen schädigen würden [182].

Referenzen

- [1] I.-N.E. Wang, H.H. Lu, Role of cell-cell interactions on the regeneration of soft tissue-to-bone interface, *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 1 (2006) 783–786. <https://doi.org/10.1109/IEMBS.2006.259456>.
- [2] J. C.E., T. J.M., J. J.C., G. H.I.M. Walenkamp, P. J., Modern Orthopaedic Implant Coatings — Their Pro's, Con's and Evaluation Methods, in: M. Aliofkhazraei (Ed.), *Modern surface engineering treatments*, InTech, Rijeka, Croatia, 2014.
- [3] P. Ceschi, A. Bohl, K. Sternberg, A. Neumeister, V. Senz, K.P. Schmitz, M. Kietzmann, V. Scheper, T. Lenarz, T. Stöver, G. Paasche, Biodegradable polymeric coatings on cochlear implant surfaces and their influence on spiral ganglion cell survival, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 102 (2014) 1255–1267. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33110>.
- [4] C.R. Arciola, D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro, J.W. Costerton, Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials, *Biomaterials* 33 (2012) 5967–5982. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.031>.
- [5] V. Carniello, B.W. Peterson, van der Mei, Henny C., H.J. Busscher, Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth, *Adv. Colloid Interface Sci.* 261 (2018) 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.10.005>.
- [6] K. Hori, S. Matsumoto, Bacterial adhesion: From mechanism to control, *Biochem Eng J* 48 (2010) 424–434. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.11.014>.
- [7] C.J. van Oss, R.J. Good, M.K. Chaudhury, The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces, *J Colloid Interface Sci* 111 (1986) 378–390. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(86\)90041-X](https://doi.org/10.1016/0021-9797(86)90041-X).
- [8] R. van der Westen, J. Sjollem, R. Molenaar, P.K. Sharma, van der Mei, Henny C., H.J. Busscher, Floating and Tether-Coupled Adhesion of Bacteria to Hydrophobic and Hydrophilic Surfaces, *Langmuir* 34 (2018) 4937–4944. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b04331>.
- [9] B.A. Jucker, H. Harms, A.J. Zehnder, Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas* (Xanthomonas) maltophilia 70401 to glass and Teflon, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 5472–5479. <https://doi.org/10.1128/jb.178.18.5472-5479.1996>.
- [10] N. Lu, T. Bevard, A. Massoudieh, C. Zhang, A.C. Dohnalkova, J.L. Zilles, T.H. Nguyen, Flagella-mediated differences in deposition dynamics for *Azotobacter vinelandii* in porous media, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 5162–5170. <https://doi.org/10.1021/es3053398>.
- [11] A. Beaussart, A.E. Baker, S.L. Kuchma, S. El-Kirat-Chatel, G.A. O'Toole, Y.F. Dufrêne, Nanoscale adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* type IV Pili, *ACS Nano* 8 (2014) 10723–10733. <https://doi.org/10.1021/nn5044383>.
- [12] S. Sharma, J.C. Conrad, Attachment from flow of *Escherichia coli* bacteria onto silanized glass substrates, *Langmuir* 30 (2014) 11147–11155. <https://doi.org/10.1021/la502313y>.
- [13] L. Vroman, Finding seconds count after contact with blood (and that is all I did), *Colloids Surf B Biointerfaces* 62 (2008) 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.11.017>.
- [14] R.B. McLay, H.N. Nguyen, Y.A. Jaimes-Lizcano, N.K. Dewangan, S. Alexandrova, D.F. Rodrigues, P.C. Cirino, J.C. Conrad, Level of Fimbriation Alters the Adhesion of *Escherichia coli* Bacteria to Interfaces, *Langmuir* 34 (2018) 1133–1142. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b02447>.
- [15] A.L.J. Olsson, van der Mei, Henny C., H.J. Busscher, P.K. Sharma, Novel analysis of bacterium-substratum bond maturation measured using a quartz crystal microbalance, *Langmuir* 26 (2010) 11113–11117. <https://doi.org/10.1021/la100896a>.
- [16] T. Das, P.K. Sharma, H.J. Busscher, van der Mei, Henny C., B.P. Krom, Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation, *Appl Environ Microbiol* 76 (2010) 3405–3408. <https://doi.org/10.1128/AEM.03119-09>.

-
- [17] Y. Chen, A.K. Harapanahalli, H.J. Busscher, W. Norde, Mei, Henny C. van der, Nanoscale Cell Wall Deformation Impacts Long-Range Bacterial Adhesion Forces on Surfaces, *Appl Environ Microbiol* 80 (2014) 637–643. <https://doi.org/10.1128/AEM.02745-13>.
- [18] H.J. Busscher, van der Mei, Henny C., How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state?, *PLoS Pathog.* 8 (2012) e1002440. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002440>.
- [19] K. Papenfort, B.L. Bassler, Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria, *Nat. Rev. Microbiol.* 14 (2016) 576–588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>.
- [20] S. Gantner, M. Schmid, C. Dürr, R. Schuegger, A. Steidle, P. Hutzler, C. Langebartels, L. Eberl, A. Hartmann, F.B. Dazzo, In situ quantitation of the spatial scale of calling distances and population density-independent N-acylhomoserine lactone-mediated communication by rhizobacteria colonized on plant roots, *FEMS Microbiol. Ecol.* 56 (2006) 188–194. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00037.x>.
- [21] S.E. Darch, O. Simoska, M. Fitzpatrick, J.P. Barraza, K.J. Stevenson, R.T. Bonnecaze, J.B. Shear, M. Whiteley, Spatial determinants of quorum signaling in a *Pseudomonas aeruginosa* infection model, *Proc Natl Acad Sci U S A* 115 (2018) 4779–4784. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719317115>.
- [22] am Jang, J. Szabo, A.A. Hosni, M. Coughlin, P.L. Bishop, Measurement of chlorine dioxide penetration in dairy process pipe biofilms during disinfection, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 (2006) 368–376. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0274-5>.
- [23] M.I. Klein, G. Hwang, P.H.S. Santos, O.H. Campanella, H. Koo, *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5 (2015). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00010>.
- [24] Y. Ren, C. Wang, Z. Chen, E. Allan, van der Mei, Henny C., H.J. Busscher, Emergent heterogeneous microenvironments in biofilms: substratum surface heterogeneity and bacterial adhesion force-sensing, *FEMS Microbiol. Rev.* 42 (2018) 259–272. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy001>.
- [25] H.-C. Flemming, Biofouling in water systems--cases, causes and countermeasures, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59 (2002) 629–640. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1066-9>.
- [26] I. Sutherland, Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework, *Microbiology (Reading, Engl.)* 147 (2001) 3–9. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-1-3>.
- [27] J.E. Brittain, K.J. Mlinar, C.S. Anderson, E.P. Orringer, L.V. Parise, Activation of sickle red blood cell adhesion via integrin-associated protein/CD47-induced signal transduction, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 1555–1562. <https://doi.org/10.1172/JCI10817>.
- [28] G. Sagvolden, I. Giaever, E.O. Pettersen, J. Feder, Cell adhesion force microscopy, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 471–476. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.471>.
- [29] A.A. Khalili, M.R. Ahmad, A. Khalili, M. Ahmad, A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications, *Int J Mol Sci* 16 (2015) 18149–18184. <https://doi.org/10.3390/ijms160818149>.
- [30] G.I. Bell, M. Dembo, P. Bongrand, Cell adhesion. Competition between nonspecific repulsion and specific bonding, *Biophys J* 45 (1984) 1051–1064. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(84\)84252-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(84)84252-6).
- [31] K. Anselme, L. Ploux, A. Ponche, Cell/Material Interfaces: Influence of Surface Chemistry and Surface Topography on Cell Adhesion, *Journal of Adhesion Science and Technology* 24 (2010) 831–852. <https://doi.org/10.1163/016942409X12598231568186>.
- [32] K. Anselme, Osteoblast adhesion on biomaterials, *Biomaterials* 21 (2000) 667–681. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00242-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00242-2).
- [33] S. Takahashi, M. Leiss, M. Moser, T. Ohashi, T. Kitao, D. Heckmann, A. Pfeifer, H. Kessler, J. Takagi, H.P. Erickson, R. Fässler, The RGD motif in fibronectin is essential for development but dispensable for fibril assembly, *J Cell Biol* 178 (2007) 167–178. <https://doi.org/10.1083/jcb.200703021>.

-
- [34] P. Honarmandi, H. Lee, M.J. Lang, R.D. Kamm, A microfluidic system with optical laser tweezers to study mechanotransduction and focal adhesion recruitment, *Lab Chip* 11 (2011) 684–694. <https://doi.org/10.1039/c0lc00487a>.
- [35] L.R. Anderson, T.W. Owens, M.J. Naylor, Structural and mechanical functions of integrins, *Biophys. Rev.* 6 (2014) 203–213. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0124-0>.
- [36] J.T. Parsons, A.R. Horwitz, M.A. Schwartz, Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (2010) 633–643. <https://doi.org/10.1038/nrm2957>.
- [37] R.P. McEver, C. Zhu, Rolling cell adhesion, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26 (2010) 363–396. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113238>.
- [38] P.J. Cullen, The plate-washing assay: a simple test for filamentous growth in budding yeast, *Cold Spring Harb. Protoc.* 2015 (2015) 168–171. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot085068>.
- [39] G.N.M. Ferreira, A.-C. da-Silva, B. Tomé, Acoustic wave biosensors: physical models and biological applications of quartz crystal microbalance, *Trends Biotechnol.* 27 (2009) 689–697. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.09.003>.
- [40] J. Wegener, A. Janshoff, H.J. Galla, Cell adhesion monitoring using a quartz crystal microbalance: comparative analysis of different mammalian cell lines, *Eur Biophys J* 28 (1999) 26–37.
- [41] F. Li, J.H.-C. Wang, Q.-M. Wang, Monitoring cell adhesion by using thickness shear mode acoustic wave sensors, *Biosens Bioelectron* 23 (2007) 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.03.018>.
- [42] V. Heitmann, J. Wegener, Monitoring cell adhesion by piezoresonators: impact of increasing oscillation amplitudes, *Anal. Chem.* 79 (2007) 3392–3400. <https://doi.org/10.1021/ac062433b>.
- [43] Z. Fohlerová, P. Skládal, J. Turánek, Adhesion of eukaryotic cell lines on the gold surface modified with extracellular matrix proteins monitored by the piezoelectric sensor, *Biosens Bioelectron* 22 (2007) 1896–1901. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.08.015>.
- [44] C. Modin, A.-L. Stranne, M. Foss, M. Duch, J. Justesen, J. Chevallier, L.K. Andersen, A.G. Hemmersam, F.S. Pedersen, F. Besenbacher, QCM-D studies of attachment and differential spreading of pre-osteoblastic cells on Ta and Cr surfaces, *Biomaterials* 27 (2006) 1346–1354. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.09.022>.
- [45] S. Hong, E. Ergezen, R. Lec, K.A. Barbee, Real-time analysis of cell–surface adhesive interactions using thickness shear mode resonator, *Biomaterials* 27 (2006) 5813–5820. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.07.031>.
- [46] D. Le Guillou-Buffello, G. Hélyary, M. Gindre, G. Pavon-Djavid, P. Laugier, V. Migonney, Monitoring cell adhesion processes on bioactive polymers with the quartz crystal resonator technique, *Biomaterials* 26 (2005) 4197–4205. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.024>.
- [47] Y. Zhu, H. Qiu, J.P. Trzeciakowski, Z. Sun, Z. Li, Z. Hong, M.A. Hill, W.C. Hunter, D.E. Vatner, S.F. Vatner, G.A. Meininger, Temporal analysis of vascular smooth muscle cell elasticity and adhesion reveals oscillation waveforms that differ with aging, *Aging Cell* 11 (2012) 741–750. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00840.x>.
- [48] Y. Fu, R. Kunz, J. Wu, C. Dong, Study of local hydrodynamic environment in cell-substrate adhesion using side-view μ PIV technology, *PLoS ONE* 7 (2012) e30721. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030721>.
- [49] M. Dembo, Y.-I. Wang, Stresses at the Cell-to-Substrate Interface during Locomotion of Fibroblasts, *Biophys J* 76 (1999) 2307–2316. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77386-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77386-8).
- [50] C.M. Kraning-Rush, J.P. Califano, C.A. Reinhart-King, Cellular traction stresses increase with increasing metastatic potential, *PLoS ONE* 7 (2012) e32572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032572>.

-
- [51] J. Huynh, F. Bordeleau, C.M. Kraning-Rush, C.A. Reinhart-King, Substrate Stiffness Regulates PDGF-Induced Circular Dorsal Ruffle Formation Through MLCK, *Cell. Mol. Bioeng.* 6 (2013). <https://doi.org/10.1007/s12195-013-0278-7>.
- [52] W.R. Legant, J.S. Miller, B.L. Blakely, D.M. Cohen, G.M. Genin, C.S. Chen, Measurement of mechanical tractions exerted by cells in three-dimensional matrices, *Nat. Methods* 7 (2010) 969–971. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1531>.
- [53] S. Khetan, M. Guvendiren, W.R. Legant, D.M. Cohen, C.S. Chen, J.A. Burdick, Degradation-mediated cellular traction directs stem cell fate in covalently crosslinked three-dimensional hydrogels, *Nat. Mater.* 12 (2013) 458–465. <https://doi.org/10.1038/nmat3586>.
- [54] M. Meseke, E. Förster, A 3D-matrigel/microbead assay for the visualization of mechanical tractive forces at the neurite-substrate interface of cultured neurons, *J. Biomed. Mater. Res. A* 101 (2013) 1726–1733. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34477>.
- [55] C.M. Kraning-Rush, S.P. Carey, J.P. Califano, B.N. Smith, C.A. Reinhart-King, The role of the cytoskeleton in cellular force generation in 2D and 3D environments, *Phys. Biol.* 8 (2011) 15009. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/8/1/015009>.
- [56] N. Tymchenko, J. Wallentin, S. Petronis, L.M. Bjursten, B. Kasemo, J. Gold, A novel cell force sensor for quantification of traction during cell spreading and contact guidance, *Biophys J* 93 (2007) 335–345. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.093302>.
- [57] D.W. Zhou, A.J. García, Measurement Systems for Cell Adhesive Forces, *J. Biomech. Eng.* 137 (2015) 209081–209088. <https://doi.org/10.1115/1.4029210>.
- [58] C.P.M. Reutelingsperger, R.G.J. van Gool, V. Heijnen, P. Frederik, T. Lindhout, The rotating disc as a device to study the adhesive properties of endothelial cells under differential shear stresses, *J Mater Sci Mater* 5 (1994) 361–367. <https://doi.org/10.1007/BF00058964>.
- [59] K.V. Christ, K.T. Turner, Methods to Measure the Strength of Cell Adhesion to Substrates, *Journal of Adhesion Science and Technology* 24 (2010) 2027–2058. <https://doi.org/10.1163/016942410X507911>.
- [60] T.A. Horbett, J.J. Waldburger, B.D. Ratner, A.S. Hoffman, Cell adhesion to a series of hydrophilic-hydrophobic copolymers studied with a spinning disc apparatus, *J Biomed Mater Res* 22 (1988) 383–404. <https://doi.org/10.1002/jbm.820220503>.
- [61] A.J. García, P. Ducheyne, D. Boettiger, Quantification of cell adhesion using a spinning disc device and application to surface-reactive materials, *Biomaterials* 18 (1997) 1091–1098. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(97\)00042-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(97)00042-2).
- [62] D.D. Deligianni, N.D. Katsala, P.G. Koutsoukos, Y.F. Missirlis, Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength, *Biomaterials* 22 (2000) 87–96. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00174-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00174-5).
- [63] A.J. Garca, P. Ducheyne, D. Boettiger, Effect of surface reaction stage on fibronectin-mediated adhesion of osteoblast-like cells to bioactive glass, *J Biomed Mater Res* 40 (1998) 48–56. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199804\)40:1<48:AID-JBM6>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199804)40:1<48:AID-JBM6>3.0.CO;2-R).
- [64] M.H. Lee, C.S. Adams, D. Boettiger, W.F. Degrado, I.M. Shapiro, R.J. Composto, P. Ducheyne, Adhesion of MC3T3-E1 cells to RGD peptides of different flanking residues: detachment strength and correlation with long-term cellular function, *J. Biomed. Mater. Res. A* 81 (2007) 150–160. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31065>.
- [65] J.E. Curtis, J.P. Spatz, Getting a grip: hyaluronan-mediated cellular adhesion, in: *Optical Trapping and Optical Micromanipulation*, Denver, CO, SPIE, 2004, p. 455.
- [66] M. Castelain, F. Pignon, J.-M. Piau, A. Magnin, M. Mercier-Bonin, P. Schmitz, Removal forces and adhesion properties of *Saccharomyces cerevisiae* on glass substrates probed by optical tweezer, *J. Chem. Phys.* 127 (2007) 135104. <https://doi.org/10.1063/1.2772270>.
- [67] M. Schwingel, M. Bastmeyer, Force mapping during the formation and maturation of cell adhesion sites with multiple optical tweezers, *PLoS ONE* 8 (2013) e54850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054850>.

-
- [68] N. Askenasy, D.L. Farkas, Optical imaging of PKH-labeled hematopoietic cells in recipient bone marrow in vivo, *Stem Cells* 20 (2002) 501–513. <https://doi.org/10.1634/stemcells.20-6-501>.
- [69] A.S. Goldstein, P.A. DiMilla, Application of fluid mechanic and kinetic models to characterize mammalian cell detachment in a radial-flow chamber, *Biotechnol. Bioeng.* 55 (1997) 616–629. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970820\)55:4<616::AID-BIT4>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970820)55:4<616::AID-BIT4>3.0.CO;2-K).
- [70] J. Friedrichs, K.R. Legate, R. Schubert, M. Bharadwaj, C. Werner, D.J. Müller, M. Benoit, A practical guide to quantify cell adhesion using single-cell force spectroscopy, *Methods* 60 (2013) 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.01.006>.
- [71] A.V. Taubenberger, D.W. Hutmacher, D.J. Muller, Single-cell force spectroscopy, an emerging tool to quantify cell adhesion to biomaterials, *Tissue Eng Part B Rev* 20 (2014) 40–55. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2013.0125>.
- [72] J.E. Sader, I. Larson, P. Mulvaney, L.R. White, Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers, *Rev Sci Instrum* 66 (1995) 3789–3798. <https://doi.org/10.1063/1.1145439>.
- [73] N.A. Burnham, X. Chen, C.S. Hodges, G.A. Matei, E.J. Thoreson, C.J. Roberts, M.C. Davies, S.J.B. Tendler, Comparison of calibration methods for atomic-force microscopy cantilevers, *Nanotechnology* 14 (2003) 1–6. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/14/1/301>.
- [74] H.-J. Butt, M. Jaschke, Calculation of thermal noise in atomic force microscopy, *Nanotechnology* 6 (1995) 1–7. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/6/1/001>.
- [75] S. Aguayo, L. Bozec, Mechanics of Bacterial Cells and Initial Surface Colonisation, *Adv. Exp. Med. Biol.* 915 (2016) 245–260. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32189-9_15.
- [76] E. Potthoff, O. Guillaume-Gentil, D. Ossola, J. Polesel-Maris, S. LeibundGut-Landmann, T. Zambelli, J.A. Vorholt, Rapid and serial quantification of adhesion forces of yeast and Mammalian cells, *PLoS ONE* 7 (2012) e52712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052712>.
- [77] A. Meister, M. Gabi, P. Behr, P. Studer, J. Vörös, P. Niedermann, J. Bitterli, J. Polesel-Maris, M. Liley, H. Heinzelmann, T. Zambelli, FluidFM: combining atomic force microscopy and nanofluidics in a universal liquid delivery system for single cell applications and beyond, *Nano Lett.* 9 (2009) 2501–2507. <https://doi.org/10.1021/nl901384x>.
- [78] E. Potthoff, D. Franco, V. D'Alessandro, C. Starck, V. Falk, T. Zambelli, J.A. Vorholt, D. Poulikakos, A. Ferrari, Toward a rational design of surface textures promoting endothelialization, *Nano Lett.* 14 (2014) 1069–1079. <https://doi.org/10.1021/nl4047398>.
- [79] A.J. Garcia, N.D. Gallant, Stick and Grip: Measurement Systems and Quantitative Analyses of Integrin-Mediated Cell Adhesion Strength, *CBB* 39 (2003) 61–74. <https://doi.org/10.1385/CBB:39:1:61>.
- [80] R.J. Klebe, J.R. Hall, P. Rosenberger, W.D. Dickey, Cell attachment to collagen: The ionic requirements, *Experimental Cell Research* 110 (1977) 419–425. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(77\)90308-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(77)90308-1).
- [81] W.L. Connors, J. Heino, A duplexed microsphere-based cellular adhesion assay, *Anal. Biochem.* 337 (2005) 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.10.044>.
- [82] W.-L. Kao, H.-Y. Chang, K.-Y. Lin, Y.-W. Lee, J.-J. Shyue, Effect of Surface Potential on the Adhesion Behavior of NIH3T3 Cells Revealed by Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring (QCM-D), *J. Phys. Chem. C* 121 (2017) 533–541. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b11217>.
- [83] S.J. Martin, V.E. Granstaff, G.C. Frye, Characterization of a quartz crystal microbalance with simultaneous mass and liquid loading, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2272–2281. <https://doi.org/10.1021/ac00020a015>.
- [84] L. Sandrin, D. Thakar, C. Goyer, P. Labbé, D. Boturyn, L. Coche-Guérente, Controlled surface density of RGD ligands for cell adhesion: evidence for ligand specificity by using QCM-D, *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 5577–5587. <https://doi.org/10.1039/C5TB00420A>.

-
- [85] W.J. Polacheck, C.S. Chen, Measuring cell-generated forces: a guide to the available tools, *Nat. Methods* 13 (2016) 415–423. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3834>.
- [86] E. Martinez, K. McGhee, C. Wilkinson, A. Curtis, A Parallel-Plate Flow Chamber to Study Initial Cell Adhesion on a Nanofeatured Surface, *IEEE Trans.on Nanobioscience* 3 (2004) 90–95. <https://doi.org/10.1109/TNB.2004.828268>.
- [87] J.J. Zwaginga, K.S. Sakariassen, G. Nash, M.R. King, J.W. Heemskerk, M. Frojmovic, M.F. Hoylaerts, Flow-based assays for global assessment of hemostasis. Part 2: current methods and considerations for the future, *J. Thromb. Haemost.* 4 (2006) 2716–2717. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02178.x>.
- [88] J.J. Zwaginga, G. Nash, M.R. King, J.W.M. Heemskerk, M. Frojmovic, M.F. Hoylaerts, K.S. Sakariassen, Flow-based assays for global assessment of hemostasis. Part 1: Biorheologic considerations, *J. Thromb. Haemost.* 4 (2006) 2486–2487. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.02177.x>.
- [89] T.G. van Kooten, J.M. Schakenraad, H.C. van der Mei, H.J. Busscher, Development and use of a parallel-plate flow chamber for studying cellular adhesion to solid surfaces, *J Biomed Mater Res* 26 (1992) 725–738. <https://doi.org/10.1002/jbm.820260604>.
- [90] N.D. Gallant, A.J. García, Quantitative analyses of cell adhesion strength, *Methods Mol. Biol.* 370 (2007) 83–96. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-353-0_7.
- [91] K.L. Sung, L.A. Sung, M. Crimmins, S.J. Burakoff, S. Chien, Determination of junction avidity of cytolytic T cell and target cell, *Science* 234 (1986) 1405–1408. <https://doi.org/10.1126/science.3491426>.
- [92] J.-Y. Shao, Quantifying cell-adhesion strength with micropipette manipulation: principle and application, *Front Biosci* 9 (2004) 2183. <https://doi.org/10.2741/1386>.
- [93] O. Thoumine, P. Kocian, A. Kottelat, J.-J. Meister, Short-term binding of fibroblasts to fibronectin: optical tweezers experiments and probabilistic analysis, *European Biophysics Journal* 29 (2000) 398–408. <https://doi.org/10.1007/s002490000087>.
- [94] K.C. Neuman, A. Nagy, Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy, *Nat. Methods* 5 (2008) 491–505. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1218>.
- [95] J. Helenius, C.-P. Heisenberg, H.E. Gaub, D.J. Muller, Single-cell force spectroscopy, *J Cell Sci* 121 (2008) 1785–1791. <https://doi.org/10.1242/jcs.030999>.
- [96] P.-H. Puech, K. Poole, D. Knebel, D.J. Muller, A new technical approach to quantify cell-cell adhesion forces by AFM, *Ultramicroscopy* 106 (2006) 637–644. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2005.08.003>.
- [97] J. Friedrichs, J. Helenius, D.J. Muller, Quantifying cellular adhesion to extracellular matrix components by single-cell force spectroscopy, *Nat. Protoc.* 5 (2010) 1353–1361. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.89>.
- [98] M.J. Lerman, J. Lembong, S. Muramoto, G. Gillen, J.P. Fisher, The Evolution of Polystyrene as a Cell Culture Material, *Tissue Eng Part B Rev* 24 (2018) 359–372. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2018.0056>.
- [99] John A. Ryan, *BioFiles* (3 August 2008).
- [100] E.M. Harnett, J. Alderman, T. Wood, The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture, *Colloids Surf B Biointerfaces* 55 (2007) 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.11.021>.
- [101] M. Barczyk, S. Carracedo, D. Gullberg, Integrins, *Cell Tissue Res.* 339 (2010) 269–280. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>.
- [102] P.E. Hall, J.D. Lathia, M.A. Caldwell, C. Ffrench-Constant, Laminin enhances the growth of human neural stem cells in defined culture media, *BMC Neurosci.* 9 (2008) 71. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-71>.
- [103] H. Kiiski, R. Aänismaa, J. Tenhunen, S. Hagman, L. Ylä-Outinen, A. Aho, A. Yli-Hankala, S. Bendel, H. Skottman, S. Narkilahti, Healthy human CSF promotes glial differentiation of

- hESC-derived neural cells while retaining spontaneous activity in existing neuronal networks, *Biol. Open* 2 (2013) 605–612. <https://doi.org/10.1242/bio.20134648>.
- [104] A.R. Vancha, S. Govindaraju, K.V.L. Parsa, M. Jasti, M. González-García, R.P. Ballester, Use of polyethyleneimine polymer in cell culture as attachment factor and lipofection enhancer, *BMC Biotechnol* 4 (2004) 23. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-4-23>.
- [105] K.K. Sadasivuni, D. Ponnamm, M. Rajan, B. Ahmed, M.A.S.A. Al-Maadeed, *Polymer Nanocomposites in Biomedical Engineering*, Springer International Publishing, Cham, 2019.
- [106] J.B. Park, R.S. Lakes, Introduction to Biomaterials, in: J.B. Park, R.S. Lakes (Eds.), *Biomaterials: An Introduction*, Springer US; Imprint; Springer, Boston, MA, 1992, pp. 1–6.
- [107] P. Santiago-Medina, P.A. Sundaram, N. Diffoot-Carlo, Titanium Oxide: A Bioactive Factor in Osteoblast Differentiation, *Int. J. Dent.* 2015 (2015) 357653. <https://doi.org/10.1155/2015/357653>.
- [108] W. Wang, Y. Ouyang, C.K. Poh, Orthopaedic implant technology: biomaterials from past to future, *Ann. Acad. Med. Singap.* 40 (2011) 237–244.
- [109] A.F. Mavrogenis, R. Dimitriou, J. Parvizi, G.C. Babis, Biology of implant osseointegration, *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 9 (2009) 61–71.
- [110] R.Z. LeGeros, Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates, *Clin Orthop Relat Res* (2002) 81–98. <https://doi.org/10.1097/00003086-200202000-00009>.
- [111] V. Alt, A. Bitschnau, F. Böhner, K.E. Heerich, E. Magesin, A. Sewing, T. Pavlidis, G. Szalay, C. Heiss, U. Thormann, S. Hartmann, W. Pabst, S. Wenisch, R. Schnettler, Effects of gentamicin and gentamicin-RGD coatings on bone ingrowth and biocompatibility of cementless joint prostheses: an experimental study in rabbits, *Acta Biomater.* 7 (2011) 1274–1280. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.11.012>.
- [112] Y. Liu, E.B. Hunziker, P. Layrolle, J.D. de Bruijn, K. de Groot, Bone morphogenetic protein 2 incorporated into biomimetic coatings retains its biological activity, *Tissue Eng.* 10 (2004) 101–108. <https://doi.org/10.1089/107632704322791745>.
- [113] A.G. Gristina, Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration, *Science* 237 (1987) 1588–1595. <https://doi.org/10.1126/science.3629258>.
- [114] G. Subbiahdoss, R. Kuijter, D.W. Grijpma, van der Mei, Henny C., H.J. Busscher, Microbial biofilm growth vs. tissue integration: “The race for the surface” experimentally studied, *Acta Biomater* 5 (2009) 1399–1404. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.12.011>.
- [115] M.C. VeDepo, M.S. Detamore, R.A. Hopkins, G.L. Converse, Recellularization of decellularized heart valves: Progress toward the tissue-engineered heart valve, *J. Tissue Eng.* 8 (2017) 2041731417726327. <https://doi.org/10.1177/2041731417726327>.
- [116] K. Mendelson, F.J. Schoen, Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges, *Ann. Biomed. Eng.* 34 (2006) 1799–1819. <https://doi.org/10.1007/s10439-006-9163-z>.
- [117] C. Hadler, P. Aliuos, G. Brandes, A. Warnecke, J. Bohlmann, W. Dempwolf, H. Menzel, T. Lenarz, G. Reuter, K. Wissel, Polymer Coatings of Cochlear Implant Electrode Surface - An Option for Improving Electrode-Nerve-Interface by Blocking Fibroblast Overgrowth, *PLoS ONE* 11 (2016) e0157710. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157710>.
- [118] P.G. Hartley, I. Larson, P.J. Scales, Electrokinetic and Direct Force Measurements between Silica and Mica Surfaces in Dilute Electrolyte Solutions, *Langmuir* 13 (1997) 2207–2214. <https://doi.org/10.1021/la960997c>.
- [119] J. Gimsa, P. Wysotzki, Š. Perutkova, T. Weihe, P. Elter, P. Marszałek, V. Kralj-Iglič, T. Müller, A. Iglič, Spermidine-Induced Attraction of Like-Charged Surfaces Is Correlated with the pH-Dependent Spermidine Charge: Force Spectroscopy Characterization, *Langmuir* 34 (2018) 2725–2733. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b04199>.
- [120] S. Tevell, B. Hellmark, Å. Nilsdotter-Augustinsson, B. Söderquist, *Staphylococcus capitis* isolated from prosthetic joint infections, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36 (2017) 115–122. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2777-7>.

-
- [121] T. Reimer, W. Baumann, J. Gimsa, Population Bursts of Parvalbumin-Positive Interneurons Inhibit Spiking Pyramidal Cells in Spontaneously Active Cortical in Vitro Networks, *J Chem Chem Eng* 6 (2012) 1033–1042. <https://doi.org/10.17265/1934-7375/2012.11.013>.
- [122] M. Stubbe, M. Nissen, J. Schroeder, J. Gimsa, The effect of hyperbaric air on the electric activity of neuronal in vitro networks, *Biosens Bioelectron* 73 (2015) 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.05.052>.
- [123] D. Depla, S. Mahieu, J.E. Greene, Sputter Deposition Processes, in: *Handbook of deposition technologies for films and coatings: Science, applications and technology*, 3rd ed., William Andrew; Elsevier Science [distributor], Norwich, N.Y, Oxford, 2009, pp. 253–296.
- [124] C. Zhao, F. Zuo, Z. Liao, Z. Qin, S. Du, Z. Zhao, Mussel-Inspired One-Pot Synthesis of a Fluorescent and Water-Soluble Polydopamine–Polyethyleneimine Copolymer, *Macromol Rapid Commun* (2015) 909–915. <https://doi.org/10.1002/marc.201500021>.
- [125] Q. Wu, J. Zhang, S. Sang, Preparation of alkaline solid polymer electrolyte based on PVA–TiO₂–KOH–H₂O and its performance in Zn–Ni battery, *J Phys Chem Solids* 69 (2008) 2691–2695. <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2008.06.132>.
- [126] A.U. Khan, Y.H. Mei, T. Wilson, A proposed function for spermine and spermidine: protection of replicating DNA against damage by singlet oxygen, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 11426–11427. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.23.11426>.
- [127] M.M. Kimberly, J.H. Goldstein, Determination of pK_a values and total proton distribution pattern of spermidine by carbon-13 nuclear magnetic resonance titrations, *Anal. Chem.* 53 (1981) 789–793. <https://doi.org/10.1021/ac00229a011>.
- [128] R. Kjellander, H. Greberg, Mechanisms behind concentration profiles illustrated by charge and concentration distributions around ions in double layers, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 450 (1998) 233–251. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(97\)00641-4](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(97)00641-4).
- [129] R. Kjellander, S. Marcelja, R.M. Pashley, J.P. Quirk, Double-layer ion correlation forces restrict calcium-clay swelling, *J. Phys. Chem.* 92 (1988) 6489–6492. <https://doi.org/10.1021/j100334a005>.
- [130] J. Urbanija, K. Bohinc, A. Bellen, S. Maset, A. Iglic, V. Kralj-Iglic, P.B.S. Kumar, Attraction between negatively charged surfaces mediated by spherical counterions with quadrupolar charge distribution, *J. Chem. Phys.* 129 (2008) 105101. <https://doi.org/10.1063/1.2972980>.
- [131] S. Perutková, M. Frank, K. Bohinc, G. Bobojevic, J. Zelko, B. Rozman, V. Kralj-Iglic, A. Iglic, Interaction between equally charged membrane surfaces mediated by positively and negatively charged macro-ions, *J. Membr. Biol.* 236 (2010) 43–53. <https://doi.org/10.1007/s00232-010-9278-x>.
- [132] R. Kjellander, Ion-ion correlations and effective charges in electrolyte and macroion systems, *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* 100 (1996) 894–904. <https://doi.org/10.1002/bbpc.19961000635>.
- [133] M. Preuss, H.-J. Butt, Direct Measurement of Particle–Bubble Interactions in Aqueous Electrolyte: Dependence on Surfactant, *Langmuir* 14 (1998) 3164–3174. <https://doi.org/10.1021/la971349b>.
- [134] P. Elter, T. Weihe, S. Bühler, J. Gimsa, U. Beck, Low fibronectin concentration overcompensates for reduced initial fibroblasts adhesion to a nanoscale topography: single-cell force spectroscopy, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 95 (2012) 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.02.026>.
- [135] M. Yu, N. Strohmeyer, J. Wang, D.J. Müller, J. Helenius, Increasing throughput of AFM-based single cell adhesion measurements through multisubstrate surfaces, *Beilstein J Nanotechnol* 6 (2015) 157–166. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.15>.

-
- [136] S.M. Buehler, M. Stubbe, S.M. Bonk, M. Nissen, K. Titipornpun, E.-D. Klinkenberg, W. Baumann, J. Gimsa, Cell Monitoring and Manipulation Systems (CMMSs) based on Glass Cell-Culture Chips (GC3s), *Micromachines* 7 (2016) 1–24. <https://doi.org/10.3390/mi7070106>.
- [137] H. Craighead, Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules, in: P. Rodgers (Ed.), *Nanoscience and nanotechnology: A collection of reviews from nature journals*, World Scientific, Singapore, 2009, pp. 330–336.
- [138] P. Tryoen-Tóth, D. Vautier, Y. Haikel, J.-C. Voegel, P. Schaaf, J. Chluba, J. Ogier, Viability, adhesion, and bone phenotype of osteoblast-like cells on polyelectrolyte multilayer films, *J Biomed Mater Res* 60 (2002) 657–667.
- [139] S. Lakard, G. Herlem, A. Propper, A. Kastner, G. Michel, N. Vallès-Villarreal, T. Gharbi, B. Fahys, Adhesion and proliferation of cells on new polymers modified biomaterials, *Bioelectrochemistry* 62 (2004) 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2003.09.009>.
- [140] Y. Bledi, A.J. Domb, M. Linial, Culturing neuronal cells on surfaces coated by a novel polyethyleneimine-based polymer, *Brain Res Prot* 5 (2000) 282–289. [https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(00\)00024-6](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(00)00024-6).
- [141] R. Timpl, H. Rohde, P.G. Robey, S.I. Rennard, J.M. Foidart, G.R. Martin, Laminin--a glycoprotein from basement membranes, *J Biol Chem* 254 (1979) 9933–9937.
- [142] S.K.W. Dertinger, X. Jiang, Z. Li, V.N. Murthy, G.M. Whitesides, Gradients of substrate-bound laminin orient axonal specification of neurons, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 12542–12547. <https://doi.org/10.1073/pnas.192457199>.
- [143] A. Domogatskaya, S. Rodin, K. Tryggvason, Functional diversity of laminins, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28 (2012) 523–553. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155750>.
- [144] P. Wysotzki, J. Gimsa, Surface Coatings Modulate the Differences in the Adhesion Forces of Eukaryotic and Prokaryotic Cells as Detected by Single Cell Force Microscopy, *International Journal of Biomaterials* 2019 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1155/2019/7024259>.
- [145] R. Mészáros, L. Thompson, M. Bos, P. de Groot, Adsorption and Electrokinetic Properties of Polyethylenimine on Silica Surfaces, *Langmuir* 18 (2002) 6164–6169. <https://doi.org/10.1021/la011776w>.
- [146] I. Varga, A. Mezei, R. Mészáros, P.M. Claesson, Controlling the interaction of poly(ethylene imine) adsorption layers with oppositely charged surfactant by tuning the structure of the preadsorbed polyelectrolyte layer, *Soft Matter* 7 (2011) 10701–10712. <https://doi.org/10.1039/c1sm05795b>.
- [147] J.-H. Choi, S.-O. Kim, E. Linardy, E.C. Dreaden, V.P. Zhdanov, P.T. Hammond, N.-J. Cho, Influence of pH and Surface Chemistry on Poly(L-lysine) Adsorption onto Solid Supports Investigated by Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring, *J Phys Chem B* 119 (2015) 10554–10565. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b01553>.
- [148] C.H. Chen, D.O. Clegg, H.G. Hansma, Structures and dynamic motion of laminin-1 as observed by atomic force microscopy, *Biochemistry* 37 (1998) 8262–8267. <https://doi.org/10.1021/bi973097j>.
- [149] L. Dao, U. Weiland, M. Hauser, I. Nazarenko, H. Kalt, M. Bastmeyer, C.M. Franz, Revealing non-genetic adhesive variations in clonal populations by comparative single-cell force spectroscopy, *Experimental Cell Research* 318 (2012) 2155–2167. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.06.017>.
- [150] S. Igalkina, B.A. Baibakov, I.V. Budunova, O. Muravjeva, L.B. Margolis, Cell-substratum-interactions: Adhesion, spreading and intracellular signalling in mammalian cells, *Biofouling* 5 (1992) 195–203. <https://doi.org/10.1080/08927019209378241>.
- [151] A. Sancho, I. Vandersmissen, S. Craps, A. Luttun, J. Groll, A new strategy to measure intercellular adhesion forces in mature cell-cell contacts, *Sci. Rep.* 7 (2017) 46152. <https://doi.org/10.1038/srep46152>.

-
- [152] R. Zange, T. Kissel, Comparative in vitro biocompatibility testing of polycyanoacrylates and poly(d,l-lactide-co-glycolide) using different mouse fibroblast (L929) biocompatibility test models, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 44 (1997) 149–157. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(97\)00082-9](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(97)00082-9).
- [153] A.G. Karakecili, T.T. Demirtas, C. Satriano, M. Gümüşderelioglu, G. Marletta, Evaluation of L929 fibroblast attachment and proliferation on Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS)-immobilized chitosan in serum-containing/serum-free cultures, *J. Biosci. Bioeng.* 104 (2007) 69–77. <https://doi.org/10.1263/jbb.104.69>.
- [154] M. Maldonado, J. Nam, The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis, *Biomed Res. Int.* 2013 (2013) 284873. <https://doi.org/10.1155/2013/284873>.
- [155] Y. Takeuchi, M. Suzawa, T. Kikuchi, E. Nishida, T. Fujita, T. Matsumoto, Differentiation and Transforming Growth Factor- β Receptor Down-regulation by Collagen- $\alpha 2\beta 1$ Integrin Interaction Is Mediated by Focal Adhesion Kinase and Its Downstream Signals in Murine Osteoblastic Cells, *J Biol Chem* 272 (1997) 29309–29316. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.46.29309>.
- [156] H. Sudo, H.A. Kodama, Y. Amagai, S. Yamamoto, S. Kasai, In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria, *J Cell Biol* 96 (1983) 191–198.
- [157] G.E. Jones, Fibronectin glycosylation modulates fibroblast adhesion and spreading, *J Cell Biol* 103 (1986) 1663–1670. <https://doi.org/10.1083/jcb.103.5.1663>.
- [158] A. Sancho, L. Vázquez, E.M. De-Juan-Pardo, Effect of cold storage on collagen-based hydrogels for the three-dimensional culture of adipose-derived stem cells, *Biofabrication* 6 (2014) 35017. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/3/035017>.
- [159] J. Joshi, G. Mahajan, C.R. Kothapalli, Three-dimensional collagenous niche and azacytidine selectively promote time-dependent cardiomyogenesis from human bone marrow-derived MSC spheroids, *Biotechnol. Bioeng.* 115 (2018) 2013–2026. <https://doi.org/10.1002/bit.26714>.
- [160] A.D. Bershadsky, N.Q. Balaban, B. Geiger, Adhesion-dependent cell mechanosensitivity, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19 (2003) 677–695. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.153011>.
- [161] A. Engler, L. Bacakova, C. Newman, A. Hategan, M. Griffin, D. Discher, Substrate Compliance versus Ligand Density in Cell on Gel Responses, *Biophys J* 86 (2004) 617–628. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74140-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74140-5).
- [162] J. Xie, M. Bao, S.M.C. Bruekers, W.T.S. Huck, Collagen Gels with Different Fibrillar Microarchitectures Elicit Different Cellular Responses, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9 (2017) 19630–19637. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b03883>.
- [163] N.C. Gauthier, T.A. Masters, M.P. Sheetz, Mechanical feedback between membrane tension and dynamics, *Trends Cell Biol.* 22 (2012) 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.07.005>.
- [164] S.P. Carey, J.M. Charest, C.A. Reinhart-King, Forces During Cell Adhesion and Spreading: Implications for Cellular Homeostasis, in: A. Gefen (Ed.), *Cellular and biomolecular mechanics and mechanobiology*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2011, pp. 29–69.
- [165] H. Delanoe-Ayari, R. Al Kurdi, M. Vallade, D. Gulino-Debrac, D. Riveline, Membrane and acto-myosin tension promote clustering of adhesion proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (2004) 2229–2234. <https://doi.org/10.1073/pnas.0304297101>.
- [166] D. Riveline, E. Zamir, N.Q. Balaban, U.S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger, A.D. Bershadsky, Focal Contacts as Mechanosensors: Externally Applied Local Mechanical Force Induces Growth of Focal Contacts by an Mdia1-Dependent and Rock-Independent Mechanism, *J Cell Biol* 153 (2001) 1175–1186.

-
- [167] N. Strohmeyer, M. Bharadwaj, M. Costell, R. Fässler, D.J. Müller, Fibronectin-bound $\alpha 5\beta 1$ integrins sense load and signal to reinforce adhesion in less than a second, *Nat. Mater.* 16 (2017) 1262–1270. <https://doi.org/10.1038/nmat5023>.
 - [168] A.-M. Galow, A. Rebl, D. Koczan, S.M. Bonk, W. Baumann, J. Gimsa, Increased osteoblast viability at alkaline pH in vitro provides a new perspective on bone regeneration, *Biochem. Biophys. Rep.* 10 (2017) 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.02.001>.
 - [169] A.-M. Galow, P. Wysotzki, W. Baumann, J. Gimsa, Enhancing the regeneration of bone defects by alkalizing the peri-implant zone – an in vitro approach, *Cur Dir Biomed Eng* 2 (2016) 547–551. <https://doi.org/10.1515/cdbme-2016-0121>.
 - [170] T. Hanawa, S. Hiromoto, K. Asami, O. Okuno, K. Asaoka, Surface Oxide Films on Titanium Alloys Regenerated in Hanks' Solution, *Mater. Trans.* 43 (2002) 3000–3004. <https://doi.org/10.2320/matertrans.43.3000>.
 - [171] R.K. Paradise, D.A. Lauffenburger, K.J. van Vliet, Acidic Extracellular pH Promotes Activation of Integrin $\alpha v\beta 3$, *PLoS ONE* 6 (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015746>.
 - [172] A.-M. Galow, Dissertation - Optimierung von in vitro Kultursystemen für Knochenzellen, Universität Rostock, 2018.
 - [173] S.M. Bonk, Dissertation - Entwicklung von Zellkultursystemen mit integrierter Sensorik und Aktuatorik für die Überwachung von Knochenzellkulturen, Universität Rostock, 2017.
 - [174] Anne-Marie Galow, Sebastian Bonk, Philipp Wysotzki, Werner Baumann, Reik Modrozynski (Universität Rostock) DE102015220651B4, 2015.
 - [175] B. Chaudhuri, B. Mondal, S.K. Ray, S.C. Sarkar, A novel biocompatible conducting polyvinyl alcohol (PVA)-polyvinylpyrrolidone (PVP)-hydroxyapatite (HAP) composite scaffolds for probable biological application, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 143 (2016) 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.03.027>.
 - [176] A.E. Pegg, Functions of Polyamines in Mammals, *J Biol Chem* 291 (2016) 14904–14912. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.731661>.
 - [177] K. Soda, Biological Effects of Polyamines on the Prevention of Aging-associated Diseases and on Lifespan Extension, *FSTR* 21 (2015) 145–157. <https://doi.org/10.3136/fstr.21.145>.
 - [178] S. Mandal, A. Mandal, H.E. Johansson, A.V. Orjalo, M.H. Park, Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (2013) 2169–2174. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219002110>.
 - [179] I.M. Saleh, I.E. Ruyter, M. Haapasalo, D. Ørstavik, Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro, *Int Endod J* 37 (2004) 193–198. <https://doi.org/10.1111/j.0143-2885.2004.00785.x>.
 - [180] B. Athanassiadis, P.V. Abbott, L.J. Walsh, The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics, *Australian Dental Journal* 52 (2007) S64–S82. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2007.tb00527.x>.
 - [181] I. HELING, D. STEINBERG, S. KENIG, I. GAVRILOVICH, M.N. SELA, M. FRIEDMAN, Efficacy of a sustained-release device containing chlorhexidine and Ca(OH)_2 in preventing secondary infection of dentinal tubules, *Int Endod J* 25 (1992) 20–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.1992.tb00944.x>.
 - [182] D. Flanagan, *Enterococcus faecalis* and Dental Implants, *J. Oral Implantol.* 43 (2017) 8–11. <https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-16-00069>.

Anhang

i. Protokoll für die Präparation und Kultivierung pränataler Kortexneurone

Dieses Protokoll beschreibt das Verfahren zur Präparation und Kultivierung von murinen pränatalen primären Neurone aus dem frontalen Kortex. Es wird allgemein am Lehrstuhl für Biophysik, Universität Rostock verwendet.

1. Geräte/ Hilfsmittel

- Inkubator (37 °C)
- Brutschrank (35,5 °C, 10 % CO₂)
- Sterilwerkbank
- Stereomikroskop
- Zentrifuge
- 15 ml Falcon- Zentrifugenröhrchen (2 Stk.)
- 50 ml Falcon- Zentrifugenröhrchen (1 Stk.)
- Zellkulturschalen 10 cm (2 Stk.)
- Zellkulturschalen 6 cm (3 Stk.)
- Zellkulturschalen 4 cm (1 Stk.)
- Pipetten & Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)
- Pasteurpipette feuerpoliert mit Saugball
- Pasteurpipette 1/2 Öffnung mit Saugball
- Substrat der Wahl für Aussaat
- Zählkammer Neubauer improved
- Präparierbesteck
 - 4 feine Pinzetten
 - 2 grobe Pinzetten
 - 2 kleine. Scheren
 - 1 große Schere
 - Skalpellklingen + Halter

2. Chemikalien/ Lösungen

- 150 – 200 ml **D1SGH + 1 % P/S**[kalt] (selbst Angesetzt)
- 3 ml **Papain** (10 units/ ml) in D1SGH [Roche Applied Science – Best. Nr. 10108014001]
- 50 µl **DNase I** (8000 units/ ml) [Roche Applied Science – Best. Nr. 11284932001]
- 25 – 50 ml **D10/10 + 1 % P/S** Präparationsmedium (selbst Angesetzt)
- Kulturmedium nach Wahl (selbst Angesetzt)
- 70 % Ethanol (EtOH)
- Meliseptol®

3. Durchführung

3.1. Allgemein

- D1SGH kaltstellen (Lagerung R01, OHNE P/S – dieses wird frisch zugesetzt)
- D10/10 warm stellen und mit CO₂ begasen lassen (Brutschrank 35,5 °C, 10 % CO₂)
- Substrat ggf. mit Adhäsionsmolekülen beschichten/ Beschichtungen spülen

- gelieferte Maus mit Cage enrichment (Tücher) versehen und in Präparationsraum stellen → min. 30 Minuten akklimatisieren lassen
- Einschalten und desinfizieren der Präparationsbank
- Vorbereiten von Präparationsbestecken und Bereitstellen von Zellkulturplastik
- Beschriften der Kulturgefäße mit Name der Zelle, Zellzahl, Datum und Kürzel

3.2. Präparation und Zellaufschluss

- trächtige Muttermaus (E16,5) mittels zervikaler Dislokation töten (große Schere)
- Tier mit 70 % EtOH gegen den Haarstrich einsprühen und die Bauchhaut mittels kleiner Schere öffnen (Bikinischnitt)
- Uterus mit grober Pinzette vorsichtig entnehmen, mittels kleiner Schere freipräparieren und in eine 10 cm ZKS mit kaltem D1SGH überführen
- beim Entnehmen darauf achten, dass der Uterus möglichst NICHT mit dem Fell und dem Äußeren des Tieres in Kontakt kommt → Kontaminationsgefahr

Weiterarbeiten unter Präparationsbank mit Stereomikroskop

- Embryonen aus dem Gebärmutterschlauch freipräparieren
- alle Föten dekapitieren und die Köpfe in eine neue 10 cm ZKS mit kaltem D1SGH überführen
- den Kopf mittels feiner Pinzette fixieren – einstechen im Bereich der Augen
- mit feiner Pinzette die Kopfhaut inkl. Schädelplatten von rostral nach caudal ziehend entfernen, sodass der Zugang zum Gehirn gewährleistet ist
- mittels Spatel oder Pinzette das Gehirn vorsichtig aus dem Kopf heben und in eine 6 cm ZKS mit wenig kalter D1SGH überführen (3 bis max. 5 Gehirne/ 6cm ZKS)
- die Hemisphären mittels Skalpell voneinander trennen – erleichtert das abtrennen der Kortizes
- frontalen Kortex mittels Skalpell abtrennen; Bulbi, Hirnhäute und Blutgefäße entfernen
- Kortizes in 4 cm ZKS mit kaltem D1SGH sammeln

Zellseparation unter Sterilwerkbank im primären Zelllabor

- D1SGH abziehen (Flüssigkeitsfilm auf dem Gewebe belassen)
- 3 ml Papain mit 50 µl DNase I versetzen und zum Gewebe geben
- 5 min bei 37 °C und 10 % CO₂ inkubieren
- Zell- Enzym- Mix mit 1000er Pipette kurz tritrieren (3x) bis grobe Gewebestücke zerkleinert sind und für weitere 5 min inkubieren
- bei 2 Falkons (15 ml) je 3 ml D10/10 vorlegen und den
- Zell- Enzym- Mix mit feuerpolierten Pasteurpipette tritrieren (ca. 10x) und auf beide Falkons aufteilen
- Je Falcon ca. 10x vorsichtig mit Pasteurpipette (1/2 Öffnung) auf- und ab pipettieren
- 2 min bei 800 U/ min (rpm) zentrifugieren
- Überstände verwerfen und Zellpellets vorsichtig in 1 ml D10/10 resuspendieren
- je Falcon weitere 1-2 ml D10/10 hinzupipettieren

- ca. 5 min große Fragmente sedimentieren lassen oder durch Zellsieb (45µm Mesh) geben
- Überstände in einem 50 ml Falcon poolen (ca. 4-6 ml ZS gesamt – ja nach zu erwartenden Zellzahl)
- Zellzahlbestimmung mittels Neubauer improved
- Verdünnung und Aussaat nach Erfordernis z.B. bei Deckgläschen → $0,1 \cdot 10^6$ Zellen/DG, bei GNCs → $25 \cdot 10^3$ Zellen/5 µl auf MEA
- ca. 1h adhären lassen und mit entsprechendem Medium auffüllen

3.3. **Kultivierung**

- Montags und donnerstags erfolgt ein Mediumswechsel bei dem $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{2}$ des Mediums getauscht wird
- in regelmäßigen Abständen wird die Osmolarität in den Kulturen überprüft und ggf. mit steril filtriertem Analysenwasser auf 310 ± 10 mOsmol/kg eingestellt

ii. **Kollagen Beschichtungsprotokoll**

Herstellerempfehlung von BIOCHROM AG, Berlin:

2. Beschichten von Kulturgefäßen mit fibrillärem Kollagen A

2.2 Zur längeren Lagerung der Kulturgefäße

1. 1 ml Kollagen A mit gleichem Volumen 0,3 M NaCl-Lösung mischen und mit 1N NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 7,0-8,0 einstellen.
2. Pro 10 cm² Bodenfläche 2 ml der verdünnten Kollagenlösung in das Kulturgefäß geben, bzw. 20 µl pro Vertiefung in eine Mikrotiterplatte.
3. Über Nacht bei Raumtemperatur (≤ 25 °C) offen im Luftstrom der Laminar-Airflow Anlage inkubieren und die Beschichtungslösung eintrocknen lassen. Steril verpackt können die Kulturgefäße bis zum Gebrauch gelagert werden (kühle, trockene Lagerung). Vor Gebrauch kurz mit Kulturmedium spülen

iii. Ergebnisse der Zwei-Wege ANOVA für die Daten aus Abschnitt 3.3

Tab. A1: Zwei-Wege ANOVA der Mess-MDFs zum Vergleich der verschiedenen Zelltypen auf den Oberflächenbeschichtungen.

statistischer Vergleich	Siliziumnitrid	PEI	PEI/Laminin	PDL/Laminin
MC3T3 vs. PNCs	**	**	-	-
MC3T3 vs. Scc	-	-	-	-
Scc vs. PNC	**	**	-	-

Tab. A2: Zwei-Wege ANOVA der Mess-MDFs von primären neuronalen Zellen (PNC).

statistischer Vergleich (PNC)	1 s Kontaktzeit	2 s Kontaktzeit	5 s Kontaktzeit
Siliziumnitrid vs. PEI	-	-	-
Siliziumnitrid vs. PEI/Laminin	-	-	-
Siliziumnitrid vs. PDL/Laminin	-	-	-
PEI vs. PEI/Laminin	*	-	*
PEI vs. PDL/Laminin	*	-	*
PEI/Laminin vs. PDL/Laminin	-	-	-

Tab. A3: Zwei-Wege ANOVA der Mess-MDFs von osteoblastenähnlichen Zellen (MC3T3).

statistischer Vergleich (MC3T3)	1 s Kontaktzeit	2 s Kontaktzeit	5 s Kontaktzeit
Siliziumnitrid vs. PEI	-	-	
Siliziumnitrid vs. PEI/Laminin	-	*	*
Siliziumnitrid vs. PDL/Laminin	-	*	*
PEI vs. PEI/Laminin	-	-	-
PEI vs. PDL/Laminin	-	-	-
PEI/Laminin vs. PDL/Laminin	-	-	-

Tab. A4: Zwei-Wege ANOVA der MDF-Messung von staphylococcus capitis sub. capitis (Scc).

Statistical differences (Scc)	1 s Kontaktzeit	2 s Kontaktzeit	5 s Kontaktzeit
Siliziumnitrid vs. PEI	-	-	-
Siliziumnitrid vs. PEI/Laminin	-	-	-
Siliziumnitrid vs. PDL/Laminin	-	-	-
PEI vs. PEI/Laminin	-	-	-
PEI vs. PDL/Laminin	*	-	-
PEI/Laminin vs. PDL/Laminin	-	-	-

Tab. A5: Vergleich der verschiedenen Zelltypen auf den Oberflächenbeschichtungen.

statistischer Vergleich	Siliziumnitrid	PEI	PEI/Laminin	PDL/Laminin
MC3T3 vs. PNCs	**	**	*	*
MC3T3 vs. Scc	**	-	-	*
Scc vs. PNC	**	**	*	-

Tab. A6: Zwei-Wege ANOVA der spezifischen MDFs von PNC für jede Kontaktzeit separat.

Statistical differences (PNC)	1 s Kontaktzeit	2 s Kontaktzeit	5 s Kontaktzeit
Siliziumnitrid vs. PEI	-	-	-
Siliziumnitrid vs. PEI/Laminin	-	-	-
Siliziumnitrid vs. PDL/Laminin	-	-	-
PEI vs. PEI/Laminin	*	-	-
PEI vs. PDL/Laminin	*	-	-
PEI/Laminin vs. PDL/Laminin	-	-	-

Tab. A7: Zwei-Wege ANOVA-Analyse der spezifischen MDFs MC3T3 für jede Kontaktzeit separat.

Statistical differences (MC3T3)	1 s Kontaktzeit	2 s Kontaktzeit	5 s Kontaktzeit
Siliziumnitrid vs. PEI	*	-	
Siliziumnitrid vs. PEI/Laminin	-	*	-
Siliziumnitrid vs. PDL/Laminin	-	*	*
PEI vs. PEI/Laminin	*	*	*
PEI vs. PDL/Laminin	*	*	*
PEI/Laminin vs. PDL/Laminin	-	-	-

Tab. A8: Two-way ANOVA analysis of the specific MDFs ($\bar{F}_{s,t}^{spec}$) of staphylococcus capitis sub. capitis (Scc) for each Kontaktzeit separately.

Statistical differences (Scc)	1 s Kontaktzeit	2 s Kontaktzeit	5 s Kontaktzeit
Siliziumnitrid vs. PEI	*	*	-
Siliziumnitrid vs. PEI/Laminin	-	*	*
Siliziumnitrid vs. PDL/Laminin	*	*	*
PEI vs. PEI/Laminin	*	*	*
PEI vs. PDL/Laminin	*	*	*
PEI/Laminin vs. PDL/Laminin	-	-	-

Tab. A9: Zwei-Wege ANOVA-Analyse für die Zelltypen. Die Signifikanzstufen sind für $p \geq 0,05$ (keine) und $p \leq 0,01$ (**) markiert.

Statistical differences	measured	specific
PNC vs. MC3T3	**	**
PNC vs. Scc	**	**
Scc vs. MC3T3	-	-

iv. Scilab-Skript zum Detektieren der Zell-Oberflächen-Abrissereignisse

Das Skript liest die csv-Dateien der einzelnen Kraft-Abstands-Kurven ein. Es unterteilt jede Kurve in Segmente von einer Länge von 250 Punkten. An diese Segmente wird mit Hilfe der Funktion `reglin` eine Gerade angelegt. Der ausgegebene Anstieg wenn der Anstieg höher als $4 \cdot 10^{-12}$ ist, wird dieses als Zell-Oberflächen-Abrissereignisse gezählt.

```

1) //clear();
2) //dir_name=uigetdir("D:\AFM\pH-
   Osteoblasten\20160329\8.4\Coll\processed");
3) file_list=ls(dir_name);
4) res=[];
5) max_res=[];
6) tic();
7) for ii=1:size(file_list,1)
8)   file_name=dir_name+"\ "+file_list(ii);
9) //file_name=uigetfile("*.csv","C:\Users\PWysotzki\Documents\AFM-
   Daten\osteoblasten\16.03.15\PEI\5s");
10)
11)   segment=3;
12)   segment_name=["extend","pause","retract");//namen der
   Segmente in den ASCII Dateien
13)   data=csvRead(file_name,ascii(9),[],"string",[],[],[],1
   );
14)   clf();
15)
16)   extend_i=find(data=="# segment: extend")+9;//header
   abschneiden
17)   pause_i=find(data=="# segment: pause")+9;
18)   retract_i=find(data=="# segment: retract")+10;
19)   //extenddata=evstr(data(extend_i+1:10:(pause_i-100)));
20)   //pausedata=evstr(data(pause_i+1:10:(retract_i-100)));
21)   retractdata=evstr(data(retract_i+1:10:$));
22)   all_retractdata=retractdata;
23)   retractdata=retractdata(:,2);// nur N nehmen
24)   step_i=[]; //Datenpunkte an denen Steps auftreten
25)   step_anstieg=[]; // Alle Anstiege in einem Vektor
26)   anstieg=[];
27)   a1_find_max=[];
28)   step_detection=25;//Daten komprimieren --> einfach nur
   jeden 25. Wert, da sonst Einlesen sehr langsam!!
29)   plot2d(retractdata)
30)   for i=1:step_detection:(length(retractdata)-
   (step_detection*2))
31)     [a1,b1]=reglin([i:i+step_detection],[retractdata(i:i+step
   _detection)']);
32)     plot2d([i:i+step_detection],([i:i+step_detection])*a1+b
   1),5);
33)     anstieg=[anstieg;a1];
34)     if a1>(1e-12) & i>60 then //a1=anstieg (default=4e-12)
   i=ausgelassene pkt. am Anfang
35)       step_i=[step_i;i];

```

```

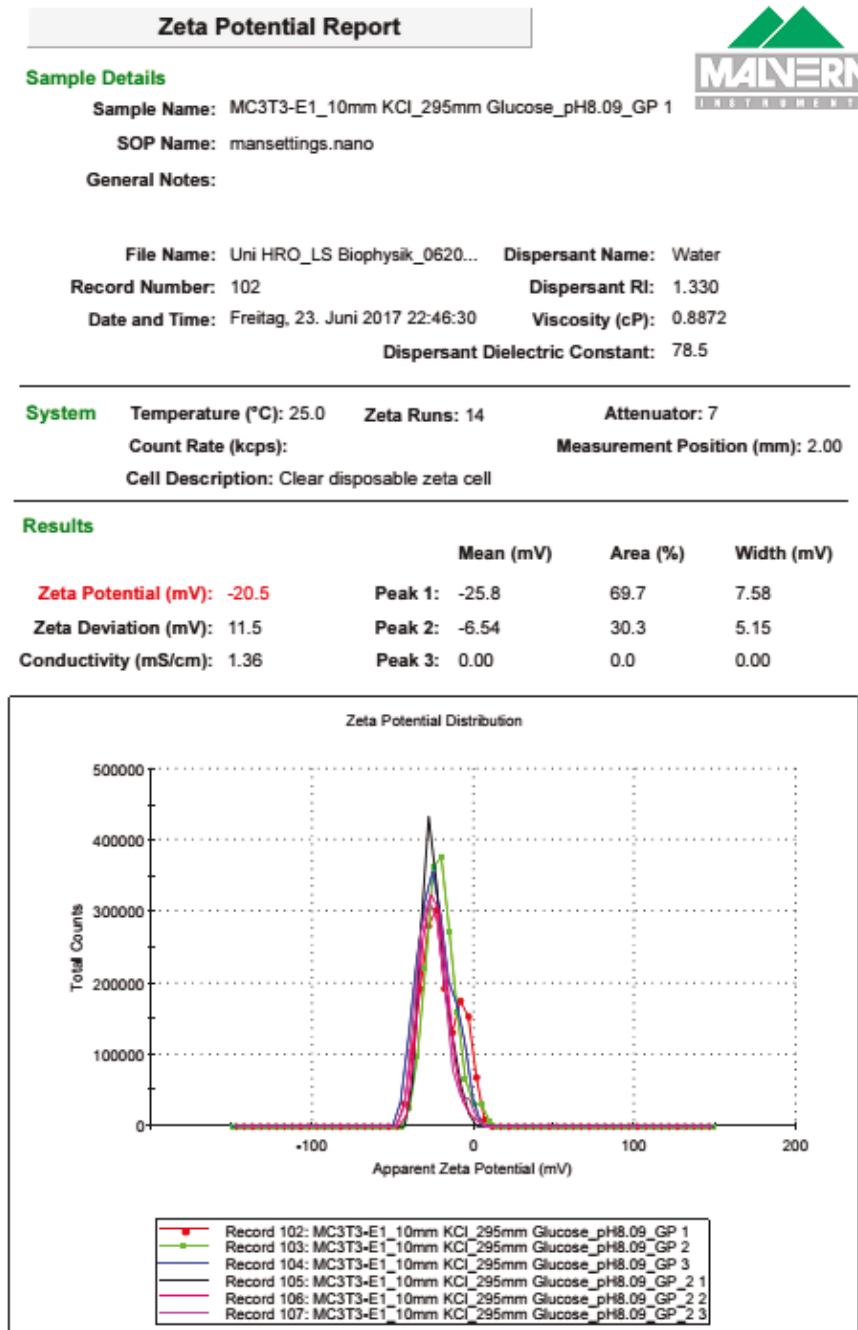
36)         step_anstieg=[step_anstieg;a1]
37)         res=[res;ii,i*10,a1,(all_retractdata(i,4)-
all_retractdata(1,4))*1e6,all_retractdata(i,2)*1e9,
(all_retractdata(i,4)-all_retractdata(i+30,4))*1e6,
(all_retractdata(i,2)-all_retractdata(i+30,2))*1e9];
38)         a1_find_max=[a1_find_max;ii,i*10,a1,(all_retractdata(i,4)-
all_retractdata(1,4))*1e6,all_retractdata(i,2)*1e9,
(all_retractdata(i,4)-all_retractdata(i+30,4))*1e6,
(all_retractdata(i,2)-all_retractdata(i+30,2))*1e9];
39)         end
40)
41)         end
42)         if size(a1_find_max,1)==0 then //Abfangen von keinem
Step, um Matrix grÖÙe zu erhalten
43)             size_max=0;
44)             a1_find_max=[0,0,0,0,0,0,0,0];
45)         else
46)             size_max=size(a1_find_max,1);
47)         end
48)         max_i=find(a1_find_max(:,4)==max(a1_find_max(:,4)))
49)         max_res=[max_res;a1_find_max(max_i,:), size_max];
50)         plot2d(step_i,retractdata(step_i),-3)
51)         plot2d(step_i+30,retractdata(step_i+30),-4)
52)         //pause
53)
54)         end
55)         //scf(2);
56)         //histplot(5, res(:,4), normalization=%t);
57)         //scf(3);
58)         //histplot(5, res(:,6), normalization=%t);
59)         //scf(4);
60)         //histplot(5, res(:,7), normalization=%t);
61)         //
62)         ///plot2d(res(:,4));
63)         //comments=["run_#;in_run_i;m_of_step;step_height[um];force[n
N];delta stepheight [um];delta force [nN];"+file_name];
64)         //comments_1=["run_#;in_run_i;m_of_step;step_height[um];force
[nN];delta stepheight [um];delta force [nN];# Steps;"+file_name];
65)         //
66)         //csvWrite(res, dir_name+"/"+ "step_results.csv" ,";",
",",[],comments);
67)         //csvWrite(max_res, dir_name+"/"+ "step_max_results.csv"
, ";", ", ",[],comments_1);
68)         cpu_t=toc()

```

v. Zeta-Potentialmessung an MC3T3 und Scc

Die in diesem Abschnitt gezeigten „Zeta Potential Reports“ wurden automatisch von der Software des Zeta-Potential Messgeräts erstellt und beziehen sich auf die Abschnitt 4.4.3.

- pH-Wert: 8,0 (MC3T3)



- pH-Wert: 7,4 (MC3T3)

Zeta Potential Report

Sample Details

Sample Name: MC3T3-E1_10mm KCl_295mm Glucose_pH 7.42_GP...

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

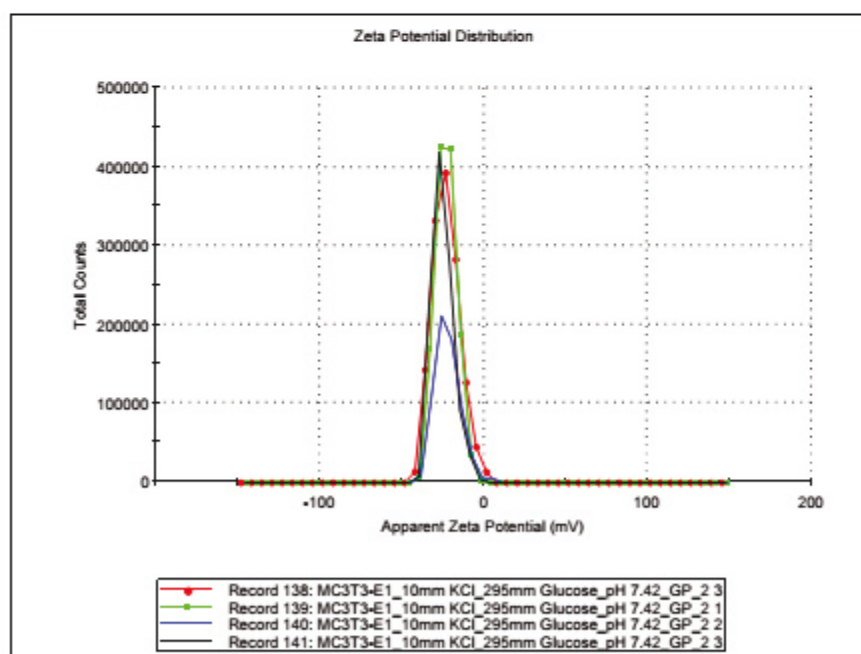


File Name: Uni HRO_LS Biophysik_0620... Dispersant Name: Water
 Record Number: 138 Dispersant RI: 1.330
 Date and Time: Freitag, 23. Juni 2017 23:37:40 Viscosity (cP): 0.8872
 Dispersant Dielectric Constant: 78.5

System Temperature (°C): 25.0 Zeta Runs: 14 Attenuator: 5
 Count Rate (kcps): Measurement Position (mm): 2.00
 Cell Description: Clear disposable zeta cell

Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -22.9	Peak 1: -22.9	100.0	8.37
Zeta Deviation (mV): 8.37	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 1.42	Peak 3: 0.00	0.0	0.00



- pH-Wert: 7,4 (Scc)

Zeta Potential Report

Sample Details

Sample Name: Staph.Captits sub. Captitis_10mm KCl_295mm Gluco...

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

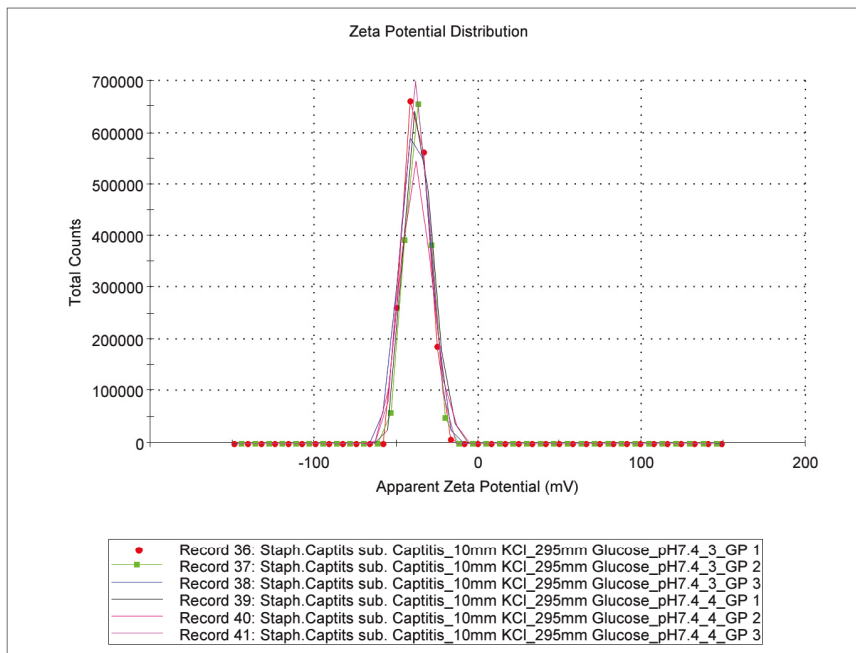


File Name: Uni HRO_LS Biophysik_0620... Dispersant Name: 295mm Glucose-10...
 Record Number: 36 Dispersant RI: 1.338
 Date and Time: Freitag, 23. Juni 2017 16:03:20 Viscosity (cP): 1.0439
 Dispersant Dielectric Constant: 78.5

System Temperature (°C): 25.0 Zeta Runs: 14 Attenuator: 3
 Count Rate (kcps): Measurement Position (mm): 2.00
 Cell Description: Clear disposable zeta cell

Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -38.0	Peak 1: -38.0	100.0	7.40
Zeta Deviation (mV): 7.40	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 2.11	Peak 3: 0.00	0.0	0.00



- pH-Wert: 8,0 (Scc)

Zeta Potential Report

Sample Details

Sample Name: Staph.Captits sub. Captitis_10mm KCl_295mm Gluco...

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

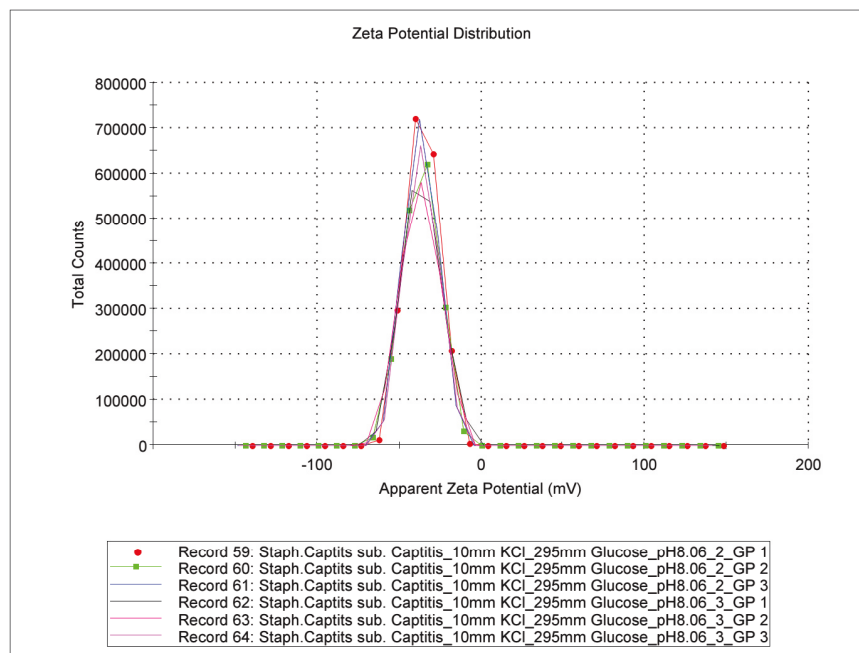


File Name: Uni HRO_LS Biophysik_0620... Dispersant Name: 295mm Glucose-10...
 Record Number: 59 Dispersant RI: 1.338
 Date and Time: Freitag, 23. Juni 2017 16:48:25 Viscosity (cP): 1.0439
 Dispersant Dielectric Constant: 78.5

System Temperature (°C): 25.0 Zeta Runs: 14 Attenuator: 3
 Count Rate (kcps): Measurement Position (mm): 2.00
 Cell Description: Clear disposable zeta cell

Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -35.7	Peak 1: -35.7	100.0	10.1
Zeta Deviation (mV): 10.1	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 2.76	Peak 3: 0.00	0.0	0.00



vi. Expose zum Patent (DE 10 2015220651)

//ALKALISIERENDE MODIFIKATION VON IMPLANTATEN UND KNOCHENBAUMATERIALIEN ZUR OPTIMIERUNG DER REGENERATION VON KNOCHENDEFEKTEN

Ref-Nr: TA-PVA11252

HINTERGRUND

Bei der vorliegenden Erfindung handelt es sich um eine gezielte Modifikation der Implantatoberfläche oder oberflächennaher Schichten mit dem Ziel, eine verbesserte Fixierung des Implantates im Knochengewebe zu realisieren. Die biologische Befestigung des Implantatwerkstoffes im Knochengewebe wird als Osseointegration bezeichnet. Eine vollständige Integration ist Voraussetzung für die mechanische Belastbarkeit. Zur ihrer Verbesserung wird vor allem versucht die mechanischen Eigenschaften der Implantatoberfläche zu verändern oder strukturell zu optimieren. Aus dem zahnmedizinischen Bereich ist es bekannt, Oberflächen mit Antibiotika, wachstums- oder adhäsionsfördernden Substanzen zu modifizieren. Da immer mehr Menschen Implantate benötigen, sind Fortschritte auf diesem Technologie-Gebiet von besonderer Bedeutung.

PROBLEMSTELLUNG

Durch strukturelle Oberflächenmodifikationen kann auch die Adhäsion von Erregern und somit eine Infektion gefördert werden. Desweiteren unterliegen die gegenwärtigen adhäsiven Beschichtungen mechanischem Stress wodurch sie nach kurzer Zeit disfunktional werden können. Auch die Einbringung von Medikamenten stellt sich in Bezug auf deren kontrollierte Freisetzung und die mögliche Absenkung des pH-Wertes währenddessen oder anderer Nebenwirkungen problematisch dar.

LÖSUNG

Abgrenzend zum aktuellen Stand der Technik, in welchem sich auf die mechanischen Eigenschaften beziehungsweise auf die strukturelle Optimierung fokussiert wird, wird bei der vorliegenden Erfindung der pH-Wert lokal modifiziert. Hierbei werden alkalisierende Substanzen in das Implantat beziehungsweise auf dessen Oberfläche gebracht. Alternativ kann eine Beschichtung des Implantates erfolgen, deren Auflösung ebenfalls zu einer Alkalisierung führt.

Durch einen alkalischen pH-Wert kann die Proliferation von Knochenzellen an



PVA Mecklenburg-Vorpommern
AG

Christian Tholen
+49 381 497474-38
c.tholen@pva-mv.de
www.pva-mv.de

ENTWICKLUNGSSTAND

Idee

PATENTSITUATION

DE 10 2015 220 651 anhängig

CATEGORIES

//Implantologie
//Oberflächentechnologien

Eigene Veröffentlichungen

Begutachtete Artikel in Fachzeitschriften:

- Wysotzki P., Sancho A., Gimsa J., Groll J., A comparative analysis of adhesion forces in initial and mature cell-material interaction. (submitted)
- Wysotzki P., Gimsa J., Surface coatings modulate the differences in the adhesion forces of eukaryotic and prokaryotic cells as detected by single cell force microscopy. *International Journal of Biomaterials* 2019 1 (7024259), pp. 1-12, DOI: 10.1155/2019/7024259
- Gimsa J., Wysotzki P., Perutkova S., Weihe T., Elter P., Marszałek P., Kralj-Iglič V., Müller T., Iglič A., Spermidine-Induced Attraction of Like-Charged Surfaces Is Correlated with the pH-Dependent Spermidine Charge: Force Spectroscopy Characterization. *Langmuir* 2018 34 (8), pp. 2725-2733, DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b04199
- Galow A., Wysotzki P., Baumann W., Gimsa J., Enhancing the regeneration of bone defects by alkalizing the peri-implant zone – an in-vitro approach. *Current Directions in Biomedical Engineering* 2016 2(1), pp. 547-551 DOI:10.1515/cdbme-2016-0121

Begutachtete Konferenzbeiträge:

- Wysotzki P., Schröder J., Behm L., Gerike S., Pfisterer F., Duschl C., Kirschbaum M., Gimsa J. and Baumann W. Switchable cell adhesive microstructures to grow defined neuronal networks. MEA Meeting 2018 - 11th International Meeting on Substrate Integrated Microelectrode Arrays. DOI: 10.3389/conf.fncel.2018.38.00102
- Behm L., Gerike S., Pfisterer F., Wysotzki P., Uhlig K., Baumann W., Bier F., Duschl C. and Kirschbaum M. Spatio-temporal control of neuronal network formation with micropatterned thermoresponsive cell culture substrates. Conference Abstract: MEA Meeting 2018 - 11th International Meeting on Substrate Integrated Microelectrode Arrays. DOI: 10.3389/conf.fncel.2018.38.00037
- Behm L., Gerike S., Pfisterer F., Wysotzki P., Uhlig K., Baumann W., Bier F., Duschl C. and Kirschbaum M. Microstructured thermoresponsive cell culture substrates for the controlled formation of oriented neuronal networks in-vitro , EUSAAT- 21st European congress on alternatives to animal testing 2018, Linz
- Wysotzki P., Baumann W., Gimsa J. A novel approach to analyse the adhesion of single prokaryotic and eukaryotic cells on multiple surfaces by single cell force microscopy, 5th Euro AFM Forum and Workshop 2017, Genf
- Wysotzki P., Galow A., Brehme H., Gimsa J. Enhancing the regeneration of bone defects by alkalizing the peri-implant zone– an in-vitro approach. *Biomedizinische Technik* 2016, Basel, DOI: 10.13140/RG.2.1.5081.0481
- Wysotzki P., Baumann W., Gimsa J. Comparison of the adhesion of single prokaryotic and eukaryotic cells to different surfaces using single cell force microscopy. *DECHEMA Single Cell Technologies* 2016, Frankfurt

- Wysotzki P., Galow A., Brehme H., Gimsa J. Single cell force microscopy method to investigate the adhesion of a single cell on multiple surfaces. 5th International Symposium Interface Biology of Implants 2015, Rostock
- Wysotzki P., Stojiljkovic A., Terasaki K., Marx A., Langel W. A liquid QCM system for extremely small volumes. Bunsentagung 2011, Berlin

Patente:

- Galow, A., Bonk, S., Wysotzki, P., Baumann, W., Medizinisches Implantat und Verfahren zu Osteoblastenkultivierung, DE 10 2015 220 651.3

Erklärung

Ich gebe folgende Erklärung ab:

1. Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsvorhaben ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen/Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

2. Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock, den 26.07.2019



Curriculum Vitae

Philipp Wysotzki
Dipl. Biochemiker

Osloer Str. 46
 18107 Rostock

geb. 9.1.1986 in Hamburg

Work experience

since June 2019

Research associate at the Chair of Biophysik

February 2016 –
 January 2019

Research associate in the DFG project "NeuroTRPE

- Development of a microstructured chip for controlling the directional growth of neurons
- Coating and chemical modification of surfaces

February 2014 –
 February 2017

Research associate in the DFG project „WELISA“

- Single cell force spectroscopy of prokaryotic and eukaryotic cells
- Development of an implant for improved adhesion and proliferation of bone cells

University education

October 2007 –
 April 2013

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
 Diplom Biochemie

- First major subject: Biophysical chemistry
- Second major subject: Molecular biology
- Diploma thesis topic: "Experimente zum Einfluss der Kontamination von TiO₂-Schichten auf die Adsorption von Biomolekülen"

School career

March 2004 –
 June 2006

Glinde Integrated Comprehensive School–Abitur

- Advanced classes: Biology and Economy/Politics

July 2003 –
 February 2004

Brookings High School

- stay abroad, USA, South Dakota

civilian service September 2006 – June 2007	family support service - Lebenshilfewerk Stormarn gGmbH <ul style="list-style-type: none"> • Working with disabled children and young adults
Internships October 2011	Schill & Seilacher "Struktol" <ul style="list-style-type: none"> • Department: Research and development of epoxy resins and flame retardants • Improvement of the standard deviation of impact strength tests on hardened epoxy resin test specimens
September 2004	Hamburgische Schiffbau – Versuchsanstalt <ul style="list-style-type: none"> • business internship • test planning

Patents & Awards

Inspired Mecklenburg-Vorpommern – Idea competition 2015

“Motiko – Motor im Koffer”; S. Bonk, P. Wysotzki, K. Breme

UNIQUE Ideas competition 2012 - 2nd place

„QLyTiX iHIT (individueller Humaner Implantat Test) - individuelle Diagnostik statt Kollektivmedizin“;

A. Marx, P. Wysotzki, W. Langel

Danksagung

Vielen Menschen, die ich während meiner Arbeit kennen und schätzen gelernt habe, bin ich zu Dank verpflichtet.

Als erstes gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Jan Gimsa, für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Dissertation als auch für die fachliche Betreuung und Begleitung während der Arbeit.

In diesem Zusammenhang darf die Nennung von Herrn Dr. Werner Baumann nicht fehlen, der stets für mich ein offenes Ohr hatte und mich Frühzeitig vor etwaigen Sackgassen bewahrt hat.

Darüber hinaus danke ich der DFG für die Förderung des Graduiertenkollegs „Welisa“ und dem Projekt „NeuroTRP“, sowie allen Betreuern des Graduiertenkollegs, als auch sämtlichen Welisa-Stipendiaten für ihre Anregungen und Diskussionen während der Workshops.

An dieser Stelle danke ich den vielfältigen und fruchtbaren Kooperationen mit Dr. Ana Sancho (Universität Würzburg) und Prof. Aleš Iglič (University of Ljubljana, Slowenien).

Jürgen Josupeit danke ich für die Möglichkeit bei ihm die Substrate zu beschichten wie auch Paul Oldorf für seine Kooperation bei der Laserbearbeitung.

Den Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeiter der Abteilung Biophysik Rostock danke ich herzlich für all ihre Unterstützung und das freundliche Arbeitsklima. Insbesondere ist Jessica Schröder für ihre Hilfe bei der Präparation und Kultivierung der murinen primären Neuronen zu danken. Reik Werner bin ich zu Dank verpflichtet, für die netten Abende bei ihm zu Hause und seinem Hund Kira, die immer ein Stück Fell bereitwillig zum Streicheln bereitgestellt hat. Mit Marion Dau und Martin Reimer konnte ich meine überschüssige Energie in ihr Hausprojekt stecken, was mich oft auf andere Gedanken gebracht hat. Marco Stubbe danke ich für die vielen Tauchgänge im In- und Ausland und für die interessanten technischen Diskussionen.

Und natürlich meinen Eltern, Irma und Matthias, und meiner Schwester Anne für ihre Unterstützung und ihr offenes Ohr zu jeder Tages- und Nacht-Zeit.